

ANNEE 1937

THÈSE

N°

160

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PRÉSENTÉE PAR

Georges BROUET

Né le 1^{er} Février 1905, à PARIS (Seine)

Ancien Interne des Hôpitaux de Paris

**DONNÉES NOUVELLES
SUR LE PNEUMOCOQUE
ET LES
INFECTIONS PNEUMOCOCCIQUES**

Président : M. FIESSINGER, Professeur

PARIS

LIBRAIRIE LOUIS ARNETTE

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

1937

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1937

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'ÉTAT

PRÉSENTÉE PAR

Georges BROUET

Né le 1^{er} Février 1905, à PARIS (Seine)

Ancien Interne des Hôpitaux de Paris

**DONNÉES NOUVELLES
SUR LE PNEUMOCOQUE
ET LES
INFECTIONS PNEUMOCOCCIQUES**

Président : M. FIESSINGER, Professeur

PARIS

LIBRAIRIE LOUIS ARNETTE

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

1937

I. — Professeurs

Anatomie	MM.
Physiologie	ROUVIERE.
Physique médicale	Léon BINET.
Chimie médicale	STROHL.
Bactériologie	POLONOVSKI.
Parasitologie et histoire naturelle médicale.....	Robert DEBRE.
Pathologie médicale et générale.....	BRUMPT.
Pathologie médicale	BAUDOUIN.
Pathologie chirurgicale	ABRAMI.
Anatomie pathologique	CHEVASSU.
Histologie	ROUSSY.
Pharmacologie et matière médicale	CHAMPY.
Thérapeutique	TIFFENEAU.
Hygiène et médecine préventive	HARVIER.
Médecine légale	TANON.
Histoire de la médecine et de la chirurgie.....	BALTHAZARD.
Pathologie expérimentale et comparée.....	LAIGNEL.
Hydrologie thérapeutique et climatologie.....	LA VASTINE
	FIESSINGER.
	Maur. VILLARET
	LOEPER.
	CARNOT.
	CLERC.
Clinique médicale	Marcel LABBE.
	LEREBOUTLET.
	NOBECOURT.
	H. CLAUDE.
	GOUGEROT.
	GULLAIN.
	LEMIERRE.
	CUNEO.
	GOSSET.
	GREGOIRE.
	LENORMANT.
	TERRIEN.
	MARION.
	BRINDEAU.
	COUVELAIRE.
	JEANNIN.
	MOCQUOT.
	OMBREDANNE.
	RATHIEPY.
	LEMAITRE.
	Pierre DUVAL.
	SERGENT.
	BEZANCON.
	MATHIEU.
	LAUBRY.
	HOVELACQUE.
	MULON.
	OLIVIER.
	VERNE.
Professeurs sans chaire	

II. — Agrégés en exercice

AMELINE	Pathologie chirurgicale.	MM.
BARIETY	Pathologie médicale.	DE GAUDART
BENARD Henri	Pathologie médicale.	D'ALLAINES
BERNARD Et.	Pathologie médicale.	DE GENNES
BESANCON (J.)	Hydrologie.	GAYET
BOULIN	Pathologie médicale.	GIROUD
BULLIARD	Histologie.	HAGUENEAU
CATHALA	Pathologie médicale.	HALPHEN
CHEVALLIER	Pathologie médicale.	HAZARD
COSTE	Pathologie médicale.	HUGUENIN
DOGNON	Physique.	JOANNON
FEY	Urologie.	LACOMME
FUNCK		LANTUEJOUL
BRENTANO	Pathologie chirurgicale.	LAROCHE Guy.
GALLIARD	Parasitologie.	LELONG
GASTINEL	Bactériologie.	
		Pathologie médicale.



MM.	
LEMAIRE	Pathologie expérimentale.
LEVEUF	Pathologie chirurgicale.
LEVY (Mlle J.) ..	Pharmacologie.
LEVY-VALENSI ..	Neurologie et Psychiatrie
MENEGAUX	Pathologie chirurgicale.
MOLLABET	Pathologie médicale.
MOREAU	Pathologie médicale.
MOULONGUET ..	Pathologie chirurgicale.
MOUQUIN	Pathologie médicale.
OBERLING	Anatomie pathologique.
PETIT- DUTAILLIS	Pathologie chirurgicale.

MM.	
PIEDELIEVRE .	Médecine légale
PORTES	Obstétrique.
RENARD (L.) ..	Ophthalmologie.
RICHT	Physiologie.
SANNIE	Chimie biologique.
SENEQUE	Pathologie chirurgicale.
TROISIER	Pathologie expérimentale
TURPIN	Pathologie médicale.
VIGNES	Obstétrique
WILMOTH	Pathologie chirurgicale

III. — Agrégés rappelés à l'exercice pour le service des examens

MM.	
ALGLAVE	Pathologie chirurgicale.
BUSQUET	Pharmacologie.
CHAILLEY- BERT	Physiologie.
GUENIOT	Obstétrique.

MM.	
LARDENNOIS....	Pathologie chirurgicale.
LEROUX	Anatomie pathologique.
NEVEU- LEMAIRE ...	Parasitologie.
PHILIBERT ...	Bactériologie.
VAUDESCAL	Obstétrique.

IV. — Agrégés chargés de cours de clinique annexe à titre permanent

MM.	
ALAJOUANINE..	Clinique médicale.
AUBERTIN	
BRULE	
CHABROL	
CHIRAY	
DONZELOT	
DUVOIR	
LIAN	
PASTEUR- VALLERY-RADOT	
SEZARY	

MM.	
BASSET	Clinique chirurgicale
BROCQ	
CADENAT	
GATELLIER ...	
HEITZ-BOYER .	
MOURE	
QUENU	
SCHWARTZ	
VELTER	
ECALLE	Clinique obstétricale.
LE LORIER	
LEVY-SOLAL ..	
METZGER	

V. — Chargés de cours

MM.	
CHAILLEY-BERT, agrégé	Education physique.
LEDOUX-LEBARD	Radiologie clinique.
PHILIBERT, agrégé	Microbiologie.
RIPPE	Stomatologie.
WEIL-HALLE	Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

DU MÊME AUTEUR

Embolie de la bifurcation aortique chez un sujet syphilitique, porteur d'un anévrysme de l'aorte abdominale, intervention chirurgicale tardive. (En collaboration avec MM. GIRODE et MORICARD). *Société Anatomique de Paris*, in *Annales d'Anat. Path.*, séance du 4 mai 1933, t. X, n° 5, mai 1933, p. 616-619.

Deux cas d'aleucie hémorragique. (En collaboration avec MM. N. FIESSINGER et F. P. MERKLEN). *Bull. et Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, séance du 26 janvier 1934, n° 3, p. 98-106.

Splénomégalie hépatolytique et ictérigène. (En collaboration avec MM. N. FIESSINGER et F. P. MERKLEN). *Bull. et Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, séance du 26 janvier 1934, n° 3, p. 91-97.

Rouget du porc chez l'homme à forme porcine et d'origine digestive. (En collaboration avec M. N. FIESSINGER). *Presse Médicale*, 2 juin 1934, n° 44, p. 889-892.

Le diabète pancréatico-splénique après la résorption d'ascite au cours des cirrhoses hépatiques. (En collaboration avec M. N. FIESSINGER). *XXIII^e Congrès Français de Médecine et XIII^e Congrès des Médecins de langue française de l'Amérique du Nord, Québec*, 27 août 1934, in *Presse Médicale*, n° 79, 3 octobre 1934, p. 1541.

Spirochétose ictéro-hémorragique après morsure de rat. Méningite purulente. (En collaboration avec MM. J. TROISIER et M. BARIÉTY). *Bull. et Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, séance du 9 novembre 1934, n° 29, p. 1451-1458.

L'épreuve de la galactosurie provoquée chez l'enfant. (En collaboration avec MM. PAISSEAU et VAILLE). *Presse Médicale*, samedi 16 février 1935, n° 14, p. 271.

Poliomyélite antérieure subaiguë. Essai de transmission au singe. (En collaboration avec MM. J. TROISIER, M. BARIÉTY, I. BERTRAND et P. GABRIEL). *Bull. et Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, séance du 8 mars 1935, n° 9, p. 408-415.

- L'épreuve du péritoine de la souris pour le diagnostic rapide des pneumococcies.** (En collaboration avec MM. J. TROISIER et M. BARIÉTY). *Bull. et Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, séance du 3 mai 1935, n° 15, p. 756-767.
- Lipomes sous-muqueux de l'estomac.** (En collaboration avec MM. VERNE, J. TROISIER et M. BARIÉTY). *Société Anatomique de Paris*, in *Annales d'Anat. Path.*, séance du 4 avril 1935, t. XII, n° 4, avril 1935, p. 475-477.
- Spirochétose méningée et méningo-typhus. Critique nosologique.** (En collaboration avec MM. J. TROISIER, M. BARIÉTY, Mlles ERBER et SIFFERLEN). *Presse Médicale*, n° 36, 4 mai 1935.
- Sténose du pylore chez un nourrisson de vingt-deux mois.** (En collaboration avec MM. G. PAISSEAU, Mlle BOEGNER et M. Ch. VAILLE). *Soc. Pédiatrie*, séance du 21 mai 1935, in *Bull. de la Soc. Péd.*, n° 5, mai 1935, p. 361.
- Pellagre.** (En collaboration avec M. H. GOUGEROT). *Bull. Soc. Fr. Dermat. et Syph.*, séance du 11 juillet 1935, p. 1401.
- L'épreuve du péritoine de la souris pour le diagnostic rapide des pneumococcies.** (En collaboration avec MM. J. TROISIER et M. BARIÉTY). *Revue critique de Pathologie et de Thérapeutique*, tome VI, sept.-oct. 1935, n° 3, p. 97-107.
- Formes érythémato-squameuses « atypiques » de la dermatite polymorphe de Brocq-Düring.** (En collaboration avec MM. H. GOUGEROT et J. HAMBURGER). *Bull. Soc. Fr. Dermat. et Syph.*, séance du 14 novembre 1935, p. 1591.
- Nouveau cas de la maladie de Fordyce (axillaire) non prurigineuse.** (En collaboration avec M. H. GOUGEROT). *Bull. Soc. Fr. Derm. et Syph.*, séance du 14 novembre 1935, p. 1592.
- Dissociation des signes cutanés et des signes généraux du pemphigus.** (En collaboration avec M. H. GOUGEROT). *Bull. Soc. Fr. Derm. et Syph.*, séance du 14 novembre 1935, p. 1597.
- Eczéma par sensibilisation à l'emplâtre simple, d'abord localisé puis disséminé. Discussions pathogéniques.** (En collaboration avec M. H. GOUGEROT). *Bull. Soc. Fr. Derm. et Syph.*, 1935, p. 1599.
- L'immunisation locale dans le psoriasis. Ses modalités. Récidive réticulée.** (En collaboration avec M. H. GOUGEROT). *Arch. Derm. Syph. Clin. Hôp. Saint-Louis*, 1935, n° 28, p. 489-502.
- Association de sclérodermies typiques et atypiques et de capillarite.** (En collaboration avec M. H. GOUGEROT). *Bull. Soc. Fr. Derm. et Syph.*, séance du 12 décembre 1935, p. 1793.

- L'eczéma professionnel par sensibilisation.** (En collaboration avec M. H. GOUGEROT). *Ann. de Clinique et de Pharmacodynamie*, janv. 1936, p. 13-17.
- Streptococcie pustuleuse généralisée, puis parakératose érythémato-squameuse.** (En collaboration avec M. H. GOUGEROT). *Bull. Soc. Fr. Derm. et Syph.*, séance du 10 janvier 1936, p. 70.
- Action plus active des médicaments antisypilitiques chez les intoxiqués et chez les mal tolérants à ces médicaments.** (En collaboration avec M. H. GOUGEROT). *Annales des Mal. vénér.*, janvier 1936, p. 32-37.
- Syphilis tertiaisée par l'arsenic. Sa place clinique et biologique entre la syphilis secondaire maligne précoce et la syphilis tertiaire tardive. Discussion d'un phénomène de Koch sypilitique.** (En collaboration avec M. H. GOUGEROT). *Annales des Maladies vénériennes*, janvier 1936, p. 37-43.
- Capillarités oblitérantes, nécrosantes, fébriles.** (En collaboration avec M. H. GOUGEROT). *Bull. Soc. Fr. de Derm. et Syphil.*, n° 2, séance du 13 février 1936, p. 391.
- Agranulocytose et herpès post-arsénobenzoliques.** (En collaboration avec MM. H. GOUGEROT, P. BLUM, R. DEGOS). *Bull. Soc. Fr. Derm. et Syph.*, séance du 13 février 1936, n° 2, p. 384.
- La pneumococcie prolongée de la souris.** (En collaboration avec MM. J. TROISIER et M. BARIÉTY). *C. R. Soc. Biologie*, vol. 12, n° 7, 15 février 1936, p. 641-642.
- Histologie de la capillarité oblitérante, nécrosante, récidivante, fébrile.** (En collaboration avec M. H. GOUGEROT et Mlle ELIAS-CHEFF). *Bull. Soc. Fr. Derm. et Syph.*, n° 3, séance du 12 mars 1936, p. 568.
- Herpès fixe récidivant sur base purpurique.** (En collaboration avec M. H. GOUGEROT). *Bull. Soc. Fr. Derm. et Syph.*, n° 3, 1936, séance du 12 mars, p. 630.
- Dermatose bulleuse, cutanée, buccale et laryngée grave rapidement et spontanément guérie.** (En collaboration avec M. H. GOUGEROT). *Bull. Soc. Fr. Derm. et Syph.*, 1936, n° 3, séance du 12 mars, p. 638.
- Erythème polymorphe, asthme, mort par œdème aigu du poumon.** (En collaboration avec M. H. GOUGEROT et ALBEAUX-FERNET). *Bull. Soc. Fr. Derm. et Syph.*, n° 5, 1936, séance du 14 mai, p. 1029.

- Essais d'inoculation au lapin du liquide des bulles de pemphigus et de dermatite polymorphe de Dühring et Brocq.** (En collaboration avec M. H. GOUGEROT). *Bull. Soc. Fr. Derm. et Syph.*, 1936, n° 6, séance du 11 juin, p. 1294.
- Agranulocytose et herpès post-arsénobenzoliques.** (En collaboration avec MM. H. GOUGEROT, P. BLUM et R. DEGOS). *Ann. Mal. vénériennes*, n° 6, juin 1936, p. 401-417.
- Les lipomes sous-muqueux de l'estomac.** (En collaboration avec MM. J. TROISIER, M. BARIÉTY). *Archiv. Mal. App. digestif*, t. 26, n° 7, juillet 1936, p. 707-808.
- Dissociation des signes cutanés et des signes généraux du pemphigus.** (En collaboration avec M. H. GOUGEROT). *Archiv. Derm. Syph. Cl. Hôp. Saint-Louis*, sept. 1936, t. VIII, fasc. III, p. 368-371.
- Observation pour la nosographie du pemphigus et des dermatites polymorphes. Dermatose bulleuse, cutanée, buccale et laryngée grave, rapidement et spontanément guérie.** (En collaboration avec M. H. GOUGEROT). *Arch. Derm. Syph. Hôp. Saint-Louis*, sept. 1936, t. VIII, fasc. III, p. 371-375.
- Formes érythémato-squameuses atypiques de la maladie de Dühring.** (En collaboration avec M. H. GOUGEROT). *Archiv. Dermat. Syphil. Cl. Hôp. Saint-Louis*, t. VIII, f. III, p. 358-368, sept. 1936.
- Association de dermatite polymorphe douloureuse de Brocq-Dühring et d'eczéma typique.** (En collaboration avec MM. H. GOUGEROT et R. DEGOS). *Arch. Derm. Syphil. Clin. Hôp. Saint-Louis*, t. VIII, fasc. III, sept. 1936, p. 351-355.
- Capillarite oblitérante, nécrosante, récidivante, fébrile, tuberculoïde histologiquement.** (En collaboration avec M. H. GOUGEROT). *Arch. Derm. Syph. Clin. Hôp. Saint-Louis*, t. VIII, f. III, p. 382-389, sept. 1936.
- Le diagnostic rapide des pneumococcies. L'épreuve du péritoine de la souris.** (En collaboration avec MM. J. TROISIER et M. BARIÉTY). *Presse Médicale*, n° 7, janvier 1937, p. 121-123.
- Le diagnostic rapide des pneumococcies. L'épreuve du gonflement de la capsule.** (En collaboration avec MM. J. TROISIER et M. BARIÉTY). *Presse Médicale*, n° 7, 17 février 1937, p. 250-252.

A MON PERE, A MA MERE

*Faible témoignage de ma reconnaissance
et de ma profonde affection.*

A MA FEMME

AUX MIENS

A MES BEAUX-PARENTS

*Témoignage de profonde gratitude pour
la confiance dont ils m'ont honoré.*

A MON BEAU-PERE

Monsieur le Docteur PAUL SAINTON
Médecin honoraire de l'Hôtel-Dieu

*Dont la maîtrise scientifique et la vie
médicale sont pour moi le plus beau des
exemples.*

A MON MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur N. FIESSINGER

Professeur de Pathologie Expérimentale à la Faculté de Médecine
Médecin de l'Hôpital Necker

Qui n'a cessé de me prodiguer les marques de son bienveillant intérêt.

Témoignage de respectueuse reconnaissance et d'entier dévouement.

A MON MAITRE

Monsieur le Professeur H. GOUGEROT
Professeur de Clinique des Maladies cutanées et syphilitiques
Médecin de l'Hôpital Saint-Louis

*Témoignage de gratitude, de respectueux
attachement et d'entier dévouement.*

A MON MAITRE

Monsieur le Docteur J. TROISIER

Professeur agrégé à la Faculté
Médecin de l'Hôpital Laënnec

En témoignage de respectueuse gratitude pour la part qu'il a prise à ma formation clinique et expérimentale, pour l'intérêt qu'il m'a constamment porté avec tant de bienveillance.

Expression de mon entier dévouement.

A MON MAITRE

Monsieur le Docteur M. HERSCHER

Médecin de l'Hôpital Lariboisière

*En remerciement de l'intérêt qu'il m'a
constamment porté.*

*Expresion de profonde reconnaissance
et de déférent attachement.*

A MON MAITRE

Monsieur le Docteur PAISSEAU

Médecin de l'Hôpital Trousseau

En reconnaissance de son précieux en-
seignement.

Témoignage de profonde gratitude.

A MON MAITRE

Monsieur le Docteur M. BARIÉTY

Professeur Agrégé à la Faculté
Médecin des Hôpitaux

*Qui veut bien m'honorer de ses conseils
et de ses encouragements.*

*Faible témoignage de respectueuse af-
fection et de vive reconnaissance.*

A MES MAÎTRES DES HOPITAUX DE PARIS

Stages

Monsieur le Professeur P. DELBET (1925-1926).

Monsieur le Professeur A. GILBERT (1926).

Monsieur le Professeur F. RATHERY (1926).

Externat

Monsieur le Professeur Agrégé E. CADENAT (1927).

Monsieur le Professeur Agrégé A. CHABROL (1928).

Monsieur le Professeur Agrégé M. GARNIER (1928).

Monsieur le Professeur H. GOUGEROT (1929).

Monsieur le Docteur M. HERSCHER (1930).

Internat provisoire

Monsieur le Professeur Agrégé M. MOUQUIN (1931).

Internat

Monsieur le Professeur Agrégé M. METZGER (1932).

Monsieur le Professeur N. FIESSINGER (1933-1934).

Monsieur le Professeur Agrégé J. TROISIER (1934).

Monsieur le Docteur G. PAISSEAU (1934-1935).

Monsieur le Professeur H. GOUGEROT (1935-1936).

Monsieur le Docteur M. HERSCHER (1936-1937).

A MES AUTRES MAÎTRES

Monsieur le Professeur Agrégé P. CHEVALLIER

Monsieur le Docteur P. NICAUD

A Messieurs les Docteurs FROMENT, GERARD-MARCHANT
DELAFONTAINE, PELLE

A mes amis : Messieurs AVENARD, CARTERET, FACQUET,
HANAUT, LAURET, MORICARD, P. NICO, J. OLIVIER,
A. PETIAU, TERRASSE

A TOUS MES AMIS

A Mesdemoiselles A.-M. MAHE
et JANINE MEYER, laborantines

*En remerciement d'une précieuse et
dévouée collaboration de deux années.*

INTRODUCTION

L'étude du pneumocoque et des infections pneumococciques marque un temps d'arrêt en France depuis le remarquable mémoire de MM. Colini, Truche et Mlle Raphaël de 1922, qui résumait les travaux de Maurice Nicolle et de ses collaborateurs de l'Institut Pasteur. Depuis cette date on ne trouve que des publications éparses se rapportant aux chapitres classiques de la bactériologie et de la clinique.

Nous avons été frappé, au contraire, en lisant les auteurs étrangers, par la place qu'ils accordent au pneumocoque et aux pneumococcies dans leurs sujets de recherches. Nous avons retenu surtout les aspects nouveaux, peu connus en France, ou regardés avec un certain scepticisme, sous lesquels apparaissent ces questions trop considérées comme définitives ou susceptibles d'un minimum de progrès.

Nous n'avons pas eu l'intention de faire une revue générale sur le pneumocoque et les infections pneumococciques ; nous nous sommes limité à l'étude de quelques données récentes : *structure chimique des pneumocoques, capsule du pneumocoque, agglutination et nouvelle classification des pneumocoques, recherches expérimentales, méthodes de diagnostic rapide des pneumococcies, traitement sérothérapique.*

Cet énoncé des divers points sur lesquels a porté notre travail constitue la liste des chapitres successivement envisagés dans ce mémoire. Le lecteur sera peut-être surpris de trouver exposée en premier lieu l'étude de la structure chimique et de la capsule des pneumocoques ; on s'apercevra cependant que cet ordre est logique, chacun des chapitres étant éclairé par l'exposé du chapitre précédent.

Nos recherches personnelles ont porté :

1° Sur la pneumococcie expérimentale de la souris (inoculation par voie sous-cutanée, intra-péritonéale, respiratoire), avec une étude systématique bactériologique et anatomo-pathologique horaire dans chaque cas.

2° Sur certaines conclusions pratiques qui en découlent, en particulier le diagnostic rapide du type d'un pneumoco-

que pathogène basé sur la classification des pneumocoques en trente-deux types spécifiques.

Nous avons pu mettre en évidence au cours de nos expériences quelques notions nouvelles sur l'infection expérimentale de la souris dont l'intérêt en pathologie générale doit être souligné et nous avons confirmé et précisé pour le clinicien français les méthodes employées couramment à l'étranger dans le diagnostic rapide des pneumococcies.

Nous exprimons notre profonde gratitude à M. le Professeur Agrégé J. Troisier qui nous a constamment guidé au cours de nos recherches et nous a fait profiter de ses éminentes critiques dans l'interprétation de nos résultats. Nous le remercions vivement de nous avoir largement ouvert son service et son laboratoire de l'hôpital Beaujon non seulement lorsque nous avons eu l'honneur et la joie d'être son interne, mais encore dans les années qui ont suivi. Nous n'oublierons pas que la réalisation de ce travail est due à son accueil si bienveillant.

Nous exprimons également notre profonde gratitude à M. le Professeur Agrégé M. Bariéty. Il nous a inspiré ce travail, nous a guidé chaque jour et dans les moments difficiles nous a fait l'honneur d'une collaboration active qui nous a été précieuse. Il nous a fait profiter de ses facultés de synthèse et de sa tendance à juger les faits expérimentaux selon leur valeur en pathologie générale.

CHAPITRE PREMIER

**STRUCTURE CHIMIQUE
DES PNEUMOCOQUES**

Le pneumocoque a été le premier germe étudié du point de vue chimique. Avery, Heidelberger, Morgan, se sont attachés à cette étude depuis douze ans. Elle a une portée générale considérable, elle fait entrevoir la possibilité de connaître la nature chimique des antigènes des principaux agents pathogènes.

Deux composants essentiels ont été isolés de divers pneumocoques : une substance hydro-soluble, polysaccharide, et une nucléo-protéide.

Dès 1915, Avery et Dochez signalent la présence d'une substance soluble spécifique dans les cultures de pneumocoques, dans le sang et les urines de malades atteints de pneumonie. Cette substance précipitée par le sérum anti-pneumococcique se montre spécifique du type de pneumocoque. Par purification de plus en plus poussée on obtient un corps présentant les caractères d'un polysaccharide et comme la substance soluble, spécifique du type.

Des polysaccharides spécifiques sont ensuite isolés des pneumocoques II et III ; après le démembrement du groupe IV, Heidelberger et Kendall étudient le type IV, un des plus fréquents.

Les propriétés physico-chimiques de ces polysaccharides, tels qu'ils sont connus actuellement, sont les suivantes :

Le polysaccharide spécifique du type I a été isolé par Avery et Heidelberger en partant de cultures de huit jours autolysées, exceptionnellement en partant du sédiment d'une culture fraîche dissoute par la bile. Il dévie la lumière polarisée de 300° vers la droite, par sa contenance en carbone (C=43,3), en hydrogène (H=5,8), en azote (N=5), ce corps s'impose comme un acétyl-polysaccharide. Il donne une réaction de précipitation spécifique avec le sérum homologue jusqu'à la dilution au 1/6.000.000. La destruction de son azote entraîne la perte de son caractère spécifique.

Le polysaccharide du type II a été obtenu par concentration de très grandes quantités de cultures en bouillon. C'est un polysaccharide non azoté. Sa teneur en carbone égale

45,8 p. 100, en hydrogène 6,4 p. 100. Il est légèrement acide, dévie la lumière polarisée de 74° vers la droite. Il est précipité par le sérum homologue à la dilution de 1/5.000.000. Par hydrolyse il donne du glucose. Son caractère spécifique disparaît par naissance de sucre de réduction.

Le polysaccharide du type III est de précipitation plus facile que celui du type II. Il contient 42,6 p. 100 de carbone, 5,4 p. 100 d'hydrogène. Son hydrolyse donne 9,5 p. 100 de glucose. C'est un acide fort. Il dévie de 33° à gauche la lumière polarisée. Il est précipité à une dilution de : 1/6.000.000 par le sérum homologue.

Le type IV est plus complexe, il contient trois polysaccharides difficiles à isoler les uns des autres. De ces trois polysaccharides, un seul est spécifique du type, un est inactif, le troisième ou substance « C » a été retrouvé ultérieurement dans les pneumocoques I, II, III et n'est pas spécifique du type mais de l'espèce. Le polysaccharide spécifique est le moins riche en azote ($N=5,5$), il contient 45,9 de carbone, 6,7 d'hydrogène. Il dévie de 30° à droite la lumière polarisée. Il est faiblement acide. Le polysaccharide inactif a une formule voisine de la précédente, il contient 46,9 de carbone, 5,9 d'azote, 6,7 d'hydrogène. C'est l'acide le plus faible. Il a le pouvoir rotatoire le plus bas, 10° vers la droite. Le polysaccharide de l'espèce ou substance C contient 6,5 d'azote, 42,1 de carbone, 6,7 d'hydrogène. Il dévie la lumière polarisée de 40° vers la droite. Il diffère des autres polysaccharides des pneumocoques en ce qu'il contient du phosphore en combinaison organique (4 p. 100). Cette substance C se retrouve dans les types I, II, III; elle donne une réaction de précipitation avec les sérums I, II, III, IV et est spécifique non plus du type mais de l'espèce.

Pour Heidelberger, Kendall, Forrest et Scherp, tous les polysaccharides trouvés dans les divers types et contrairement aux données classiques, sont thermo-labiles.

Dubos en 1932 a étudié une endo-enzyme bactérienne ayant la propriété de décomposer le polysaccharide du type III en milieu aérobie et anaérobie, cette décomposition pou-

vant même s'effectuer en présence de sérum. Il y a une relation quantitative entre la quantité totale de substance décomposée et la quantité d'enzyme employée.

La nucléo-protéide des pneumocoques étudiée dès 1923 par Avery et Heidelberger est obtenue en précipitant par l'acide acétique une solution de pneumocoques lysés par la bile. Elle donne les réactions de coloration habituelles des nucléo-protéides. Elle contient 16 p. 100 d'azote, 0,5 p. 100 de phosphore. La solution de nucléo-protéide préparée avec un type de pneumocoque donne un précipité comparable avec tous les types de sérum antipneumococcique. Les pneumocoques avirulents, dégradés, dépouillés de toute spécificité de type donnent la même réaction.

Tels sont les caractères chimiques fondamentaux des composants connus des pneumocoques.

L'étude de leurs propriétés immunologiques a donné des résultats intéressants.

Avery et Morgan constatent d'abord que les polysaccharides ne déterminent généralement pas la formation d'anticorps chez l'animal. Cependant Ross en 1931 employant les polysaccharides par voie buccale, réussit des immunisations chez le rat. Avery et Gœbel reprennent leurs recherches en 1933 avec le polysaccharide du type I. Ils constatent que les souris injectées par voie péritonéale avec de très petites quantités, développent une immunité active contre une infection ultérieure par le pneumocoque I. L'immunité ainsi produite est spécifique du type et n'apparaît pas avec de grosses quantités de polysaccharide. Chez le lapin les résultats sont tout autres, aucun anticorps ne peut être développé dans le sérum après injections répétées du polysaccharide du type I.

Les essais d'immunisation avec l'endo-enzyme bactérienne ayant la propriété de décomposer le polysaccharide spécifique du type III ont donné d'excellents résultats chez la souris et le lapin.

La nucléo-protéide pneumococcique a un pouvoir immunisant certain. Elle détermine la formation d'anticorps mais

les sérums obtenus ne sont pas spécifiques du type mais de l'espèce.

L'immunisation par des solutions de pneumocoques désintégrés (par autolyse) contenant à l'état libre le polysaccharide spécifique du type et la nucléo-protéide, ne permet d'obtenir qu'un sérum spécifique de l'espèce.

En employant pour immuniser des animaux une solution de pneumocoques contenant à la fois des cellules intactes et les produits solubles de la désintégration cellulaire, il se développe non seulement des anticorps contre le type spécifique mais encore des anticorps réagissant avec la substance protéique commune : on obtient des sérums spécifiques du type comme de l'espèce. La précipitation est parallèle à la formation d'anticorps. Quand les pneumocoques intacts dominent, c'est la présence d'anticorps dus à la nucléo-protéide dont la zone d'activité est plus large qui est responsable des agglutinations croisées. Les deux sortes d'anticorps sont séparés par les tests d'absorption (voir p. 46).

Avery et Gœbel en 1933, combinant synthétiquement divers dérivés sucrés avec une même protéine (globuline du sérum de cheval), étudient les propriétés immunologiques spécifiques de ces corps sur le lapin. Ils réussissent à immuniser des lapins avec ce complexe sucre-protéine. Ils ne peuvent le faire avec l'hydrate de carbone seul. De leur étude d'ensemble ils concluent qu'une seule différence dans la configuration structurale d'un simple atome de carbone détermine la spécificité sérologique des sucres : une inversion des radicaux H-OH et H sur un atome de carbone suffit à déterminer l'individualité spécifique.

Ils reprennent cette étude avec deux isomères d'un même glucoside et obtiennent des précipitations croisées qui cependant n'empêchent pas une différenciation spécifique après épreuve d'absorption.

Ces recherches sur la composition chimique des pneumocoques et sur les propriétés immunologiques de leurs composants sont du plus haut intérêt. Elles ont ouvert la voie à l'étude d'autres germes : méningocoque (différentes races),

streptocoque, bacille typhique, bacille de Koch, chez lesquels on a pu identifier des substances spécifiques sans pouvoir immunisant. Particulièrement intéressante est l'étude du bacille de Friedländer type E dont on a isolé un hydrate de carbone très voisin de celui du pneumocoque II avec un pouvoir rotatoire différent ; les hydrates de carbone des deux germes sont précipités par les sérums croisés, le sérum de l'un est actif sur le germe de l'autre. On peut les différencier par la méthode de l'absorption.

Ces expériences sont trop peu nombreuses et les résultats de certaines d'entre elles trop incertains pour permettre de conclure actuellement de façon formelle. Leur intérêt apparaît néanmoins considérable, cette nouvelle orientation biochimique de la bactériologie, pleine de difficultés, permet d'envisager sous un jour nouveau le problème des infections et de l'immunité.

CHAPITRE II

LA CAPSULE DU PNEUMOCOQUE

Le pneumocoque appartient au groupe des microbes encapsulés. Sa capsule se présente sous la forme d'une enveloppe plus ou moins large qui enferme le corps microbien. Elle fait partie de la cellule microbienne et pour le pneumocoque type III se distingue de l'enveloppe muqueuse qui est un produit de sécrétion extra-cellulaire.

Nous étudierons successivement la mise en évidence de la capsule, les réactions de gonflement spécifique et non spécifique où apparaissent les liens qui unissent cette propriété à la nature chimique de la capsule.

I. — Mise en évidence de la capsule

Normalement sur les préparations non colorées examinées entre lame et lamelle, la *capsule est invisible*, parce que sa transparence et son indice de réfraction sont voisins de ceux du milieu qui l'entoure.

Les méthodes de coloration habituelle mettent mal en évidence la capsule abîmée par la fixation. De très nombreuses techniques ont été proposées pour la coloration des capsules microbiennes. Leur nombre indique justement l'inconstance des résultats obtenus. A côté des méthodes couramment employées dans nos laboratoires (technique de Hardouin, de Buerger), nous croyons intéressant de présenter trois techniques qui fournissent d'excellentes préparations. Comme nos méthodes, elles sont de deux ordres : représentation négative, colorations spéciales.

On emploie pour la représentation négative en milieu humide une solution de collargol à 15 p. 100 que l'on mélange à des pneumocoques en bouillon ou en émulsion saline. On examine ce mélange en couche mince entre lame et lamelle avec l'objectif à immersion ou directement au fort grossissement. La capsule apparaît comme un halo entourant le corps microbien dont le bord externe est formé par l'entourage sombre. L'avantage du collargol sur l'encre de Chine est de détacher moins nettement la zone périphérique claire qui

apparaît chez certains microbes sans capsules. Plus difficile est la différenciation entre capsule et enveloppe muqueuse pour les pneumocoques du type III. Dans la règle la capsule est plus nettement limitée que l'enveloppe muqueuse. L'ébullition la fait disparaître la plupart du temps. Dans les cas difficiles, on se souviendra que l'enveloppe muqueuse, produit de sécrétion, manque dans les cultures jeunes poussées à basse température ainsi que dans les cultures très vieilles où elles se détachent du corps microbien.

Cette méthode de représentation en négatif de la capsule, en milieu humide, est la plus recommandable. Les résultats sont dans l'ensemble plus constants. Elle peut s'appliquer aux exsudats et aux crachats.

La méthode de coloration de Muir-Levinthal est pratiquée un peu différemment selon que les pneumocoques sont issus de l'animal ou d'une culture.

Dans le premier cas une préparation étalée en couche mince est fixée à la flamme. On la colore à chaud pendant deux minutes avec du carbolfuschine concentré. Après avoir soigneusement rincé à l'eau on recouvre la préparation pendant une minute avec un mordant (2 parties de sublimé, 2 de tanin, à 20 p. 100, 5 d'alun de potasse à saturation). On rince à l'eau. On trempe, pendant une seconde, la lame dans l'alcool méthylique. Nouveau rinçage à l'eau puis coloration pendant une à deux minutes avec le bleu de méthyle de Loeffler.

Dans le second cas, une œse de culture de bouillon ou d'une émulsion en sérum physiologique est mélangée à une œse de sérum de lapin normal et étalée en couche mince. Après fixation pendant une minute à l'alcool méthylique la coloration est effectuée comme précédemment.

Dans les deux cas, la capsule apparaît en bleu, le corps microbien en rouge de façon très démonstrative.

La méthode de coloration de Mann, Hunton et Taylor, désignée sous l'abréviation M. H. T., a été publiée par Williams et Gurley. Une œse de culture sur bouillon, d'émulsion en sérum physiologique, est mélangée avec une œse de nu-

trose à 3 p. 100. Après séjour au bain-marie pendant une heure on ajoute quelques gouttes de la solution à 0,5 p. 100 de carbol-fuchsine. On étale en couche mince et on colore quatre minutes avec une solution de cristal violet (0,10 gr. de cristal violet, 0,25 gr. d'acide acétique glacial, 100 cc. d'eau). On lave avec une solution de sulfate de cuivre à 20 p. 100 et l'on sèche sur papier buvard. Le corps microbien apparaît coloré en violet ainsi que le bord de la capsule. Le fond de la préparation n'est pas coloré.

La mise en évidence de la capsule du pneumocoque est facile quand le germe provient de l'animal; elle est beaucoup plus difficile sur les pneumocoques de culture. Les avis ont été différents sur l'existence d'une capsule dans ce dernier cas; actuellement la majorité des auteurs admet l'existence des capsules pour tous les types de pneumocoques virulents, même en cultures privées d'albumine. L'adjonction de glucose, de sérum ou de sang aux milieux de culture augmente la grandeur des capsules mais les cocci perdent leur forme typique lancéolée, s'arrondissent, augmentent de dimensions et sont mal colorables. Nos recherches personnelles ont montré que les pneumocoques en culture conservent leur capsule à la condition qu'ils soient virulents.

L'étude des dimensions des capsules montrent leur inégalité selon le type du pneumocoque et selon les souches dans un même type. Dans des conditions de vie différentes les dimensions de la capsule varient pour une même souche.

L'image capsulaire mérite d'être approfondie chez les souches du pneumocoque III qui se caractérisent par la formation d'une enveloppe muqueuse (*pneumococcus mucosus*). Par la méthode humide au collargol les cocci apparaissent entourés d'une enveloppe très large. Si on emploie l'encre de Chine au lieu du collargol on distingue deux zones dans l'enveloppe; la plus interne, étroite, enserme le corps bactérien, apparaît claire, elle représente la capsule propre; la deuxième zone, plus externe, moins nettement limitée, est l'enveloppe muqueuse.

II. — Réaction de gonflement spécifique des capsules

La réaction de gonflement spécifique des capsules a été décrite en 1902 par Neufeld. Il constate que par adjonction de sérum de lapin immunisés, des pneumocoques gonflent au double ou au triple de leur taille et prennent un aspect « vitreux ». Il remarque que l'augmentation de volume se fait aux dépens de la couche externe du pneumocoque dont le centre reste inchangé.

Actuellement la technique employée par Neufeld et Tulczynska pour le gonflement des capsules est la suivante : une œse de culture ou de suc d'organe est mélangée sur lame avec une œse d'immun-sérum non dilué (s'il s'agit de sérum à titre élevé dilution au 1/5 ou au 1/10). L'examen en goutte pendante se fait à l'immersion ou au fort grossissement à sec. Même isolés les pneumocoques gonflés sont facilement reconnaissables. L'absence de telles formes dans une goutte de contrôle avec du sérum normal assure le diagnostic. On obtient de belles images démonstratives en ajoutant une œse de bleu de méthyle de Loeffler dilué au 1/5. Le corps du pneumocoque se colore en bleu, la partie gonflée apparaît incolore, vitreuse, entourant les cocci bleus. La réaction se produit aussitôt avec du sérum de lapin immunisé, on l'obtient également avec du sérum de cheval *concentré*. Le premier donne cependant des images beaucoup plus nettes. La réaction peut être faite dans le sang, dans le suc d'un organe infecté, dans les sérosités pleurales, péritonéales, cérébro-spinales, et dans l'expectoration. *Cette réaction est spécifique du type : par l'adjonction de sérum spécifique, la capsule est devenue visible.*

Nous avons vu que pour Avery, Heidelberger et leurs collaborateurs, l'hydrate de carbone spécifique du type siège dans la capsule. La perte de cet hydrate de carbone opère le passage de la forme virulente S en variante R privée de capsule. Nous rappellerons que ces variétés S (smooth ou lisse) et R (rough ou rugueuse) correspondent à des aspects

cultureux différents de certaines souches de pneumocoques sur milieux solides. La variété S correspond aux colonies classiques, caractéristiques des pneumocoques virulents pour la souris. La variété R correspond à des colonies à surface irrégulière, rugueuse, tomenteuse lorsqu'on les regarde à un très fort grossissement, marquées assez souvent d'une dépression circulaire isolant un centre acuminé ; ces souches apparaissent à l'examen microscopique privées de capsules et sont avirulentes pour la souris. Il s'en faut d'ailleurs que ces deux variétés décrites par Griffiths résument les caractères cultureux des souches conservées longtemps au laboratoire ; Cotoni et Pochon ont fait récemment une étude approfondie des aspects multiples qu'on peut observer.

Quand on ajoute du sérum homologue à des pneumocoques virulents, le sérum opère une précipitation immédiate de l'hydrate de carbone qui se trouve dans la capsule. Les précipitations qui se produisent rendent la capsule visible en même temps que celle-ci grandit fortement. Le gonflement de même que la précipitation ne peuvent être provoqués que par du sérum non dilué ou faiblement dilué.

Pour étudier les dimensions relatives d'une capsule gonflée E. Tulczynska emploie l'élégant procédé suivant : Une émulsion de pneumocoque II (issue d'une culture ou de l'animal) est mélangée en deux gouttes pendantes avec du sérum de lapins I et II. Le gonflement n'existe que dans la goutte de sérum homologue II. Les deux gouttes restant isolées sont étalées en couche mince sur la même lame, puis fixées à l'alcool méthylique et colorées selon la méthode de Muir. Sur le premier frottis avec sérum hétérologue on voit les capsules typiques qui apparaissent d'un beau bleu ; sur le deuxième frottis elles sont une fois et demie à deux fois plus grandes et colorées en rouge. L'action du sérum homologue provoque donc un agrandissement de la zone capsulaire et une modification de sa colorabilité.

Les sérums de cheval et de lapin déterminent pour une même souche des images de gonflement différentes. Cela tient sans doute à ce que le sérum de lapin donne à l'hydrate de

carbone précipité l'aspect de petites gouttes brillantes alors qu'avec le sérum de cheval le précipitat apparaît comme un amas granuleux fin.

La zone gonflée est à peu près proportionnelle à la taille normale de la capsule.

Le pneumocoque III est une variété intéressante à étudier en raison de sa propriété de sécréter une enveloppe muqueuse. Normalement les pneumocoques vivants sécrètent un hydrate de carbone libre et spécifique. Il a pu être mis en évidence dans des cultures de 7 à 10 heures par Morgan. L'enveloppe muqueuse est imprégnée par cet hydrate de carbone. Le sérum homologue que l'on ajoute pénètre lentement à travers le mucus et précipite d'abord le polysaccharide au bord de l'enveloppe muqueuse. Le pneumocoque apparaît alors entouré d'un bord brillant distant du corps microbien et non comme il le sera plus tard d'une zone large et brillante ; ces deux aspects correspondent à des stades divers du gonflement.

Sur d'autres types, en employant le sérum homologue de cheval on peut également suivre la précipitation progressive de l'hydrate de carbone au cours des premières minutes.

Les pneumocoques gonflés ne sont pas lésés dans leur capacité vitale, il est même remarquable qu'ils n'autolysent pas (intérêt pour la conservation). Les pneumocoques tués par la chaleur gonflent aussi bien que les pneumocoques vivants, mais si des pneumocoques gonflés par adjonction de sérum homologue sont chauffés le gonflement rétrocede et ne reparait qu'après adjonction de sérum frais. E. Tulczynska, de la même façon, a pu montrer que les précipitats spécifiques obtenus *in vitro* peuvent se résoudre sous l'action courte de la chaleur et reparaitre à nouveau par l'adjonction de sérum frais. *Le gonflement est donc identique dans son essence à la précipitation*, dans le premier cas c'est l'hydrate de carbone qui se trouve dans la capsule qui précipite, dans le second c'est l'hydrate de carbone libre.

Les relations qui existent entre la capsule et la virulence sont bien connues. En règle, les pneumocoques encapsulés

possèdent une virulence déterminée forte ou faible pour les animaux de laboratoire ; les dimensions de la capsule n'ont aucun rapport direct avec la virulence. Les différents types de pneumocoques possèdent de grandes différences de virulence qui ne peuvent s'expliquer que par la nature différente des polysaccharides qui semblent jouer un rôle essentiel dans la virulence spécifique des pneumocoques. Si l'on bloque ces substances par un sérum homologue ou si on les détruit par un ferment (endo-enzyme de certaines bactéries) les pneumocoques perdent en même temps leurs capsules et leur pouvoir pathogène pour l'animal.

III. — Réactions de gonflement non spécifique des capsules

On peut obtenir une réaction de gonflement de la capsule en employant des substances non spécifiques, tels que des sels de métaux lourds : plomb, fer, aluminium. La technique de gonflement est la même. Mais si l'on compare la réaction obtenue à celle fournie par un sérum spécifique, on constate que les capsules apparaissent avec leurs dimensions réelles telles qu'on les met en évidence par simple coloration. La réaction s'est bornée à rendre la capsule visible.

Le mécanisme de ces réactions non spécifiques semble le même que celui des réactions spécifiques. L'hydrate de carbone précipite par le sel métallique et rend la capsule visible.

Ces données récentes sur la capsule du pneumocoque sont valables avec quelques variantes pour toutes les capsules microbiennes.

Il faut souligner le puissant intérêt de biologie générale qui découle des recherches précédentes. Elles expliquent par une réaction physico-chimique (comparable à celle qu'on peut provoquer *in vitro*) des modifications visibles du microbe qui constituaient jusqu'à ces dernières années un phénomène biologique mystérieux.

IV. — Expériences personnelles

Nos expériences ont porté sur le gonflement spécifique de la capsule. Nous ne nous étendrons pas sur les résultats que nous avons obtenus ; ils confirment en tous points les données établies par Neufeld et les divers auteurs.

Les essais effectués avec les sérums équins habituellement employés en France ne nous ont donné aucun résultat. Il n'en fut pas de même avec les trente-deux sérums de lapin préparés pour l'identification des types au laboratoire de G. Cooper. Avec ces sérums nous avons observé des gonflements capsulaires typiques, répondant aux aspects envisagés plus haut (p. 36).

Nous avons obtenu ces images à partir de cultures virulentes de pneumocoques, dans le sang de souris inoculées, dans divers pus, dans la sérosité péritonéale de souris inoculées par voie péritonéale où les images caractéristiques montrent *le gonflement associé à l'agglutination* (fig. 9, p. 121), dans les crachats de sujets atteints de pneumococcie aiguë, le gonflement capsulaire généralement isolé pouvant là encore s'associer à une agglutination (fig. 10, p. 125).

Pour la recherche du gonflement capsulaire dans les crachats nous nous sommes heurté au début à quelques difficultés qu'il nous semble intéressant de souligner. La parcelle de crachat employée doit être mélangée intimement à la quantité de sérum correspondant, particulièrement dans le cas de crachats gommeux très riches en mucine la pénétration par le sérum paraissant plus difficile ; il semble également qu'il y ait avantage à employer dans ces cas une quantité de sérum plus importante. Enfin on ne se hâtera pas de donner une réponse négative : si dans la majorité des cas le gonflement apparaît en quelques minutes il faut laisser s'écouler parfois un certain temps (de 15 minutes à plusieurs heures) pour observer la modification des pneumocoques.

Si le gonflement des capsules des pneumocoques est la règle dans l'expectoration des pneumococcies aiguës et des

produits pneumococciques virulents, les résultats négatifs sont les plus fréquents lorsqu'on étudie des expectorations banales, même renfermant des germes assez nombreux, ou des pneumocoques dépourvus de virulence.

Les préparations peuvent être conservées pendant plusieurs mois si l'on prend la précaution de luter soigneusement le mélange du produit pneumococcique et du sérum examiné entre lame et lamelle. Ce fait semble en rapport avec le phénomène du gonflement capsulaire qui empêche l'autolyse des pneumocoques.

CHAPITRE III

**AGGLUTINATION
NOUVELLE CLASSIFICATION
DES PNEUMOCOQUES**

L'étude des groupes de pneumocoques est étroitement liée à celle de l'agglutination.

Dès 1891 Metchnikoff mettait en évidence le pouvoir agglutinant du sérum de sujets vaccinés ; puis Bezançon et Grifon, dans une série de recherches sur le sang des pneumoniques, décelaient la présence d'agglutinines et posaient déjà la question des « races » en présence de sérums n'agglutinant que certaines souches de pneumocoques.

Ultérieurement cette notion de races devait prendre une grande importance ; des groupes de pneumocoques étaient progressivement distingués d'après leur comportement en présence de sérum de cheval ou de lapin vaccinés avec des souches différentes.

Nous étudierons successivement dans ce chapitre les techniques employées et l'historique des classifications successivement proposées pour en arriver à la conception qui nous semble pouvoir être acceptée aujourd'hui.

I. — Techniques

1° TECHNIQUE DE M. NICOLLE, JOUAN ET E. DEBAINS POUR L'AGGLUTINATION DES PNEUMOCOQUES

On centrifuge une culture en milieu T âgée de 16 heures. Le culot est émulsionné dans l'eau salée à 10 p. 1.000 à raison de un ctgr. de germes pour 20 cc. de solution saline. On répartit ensuite, dans des tubes, par doses de un cc., et l'on ajoute des quantités décroissantes de sérum (1/20, 1/50, 1/100, 1/200 de cc.), on bouche à l'ouate et on agite pendant cinq minutes environ. Quand on n'observe pas d'agglutination on abandonne les tubes à la température du laboratoire pour relire les résultats le lendemain.

Nous verrons les idées des mêmes auteurs sur certains pneumocoques inagglutinables susceptibles d'être agglutinés après un traitement spécial. C'est ce point de technique que nous donnons ici (méthode de Porge modifiée) : on ajoute à

20 cc. d'émulsion microbienne, un dixième de cc. d'acide chlorhydrique normal ; on plonge cinq minutes dans l'eau bouillante, on refroidit sous un courant d'eau et on neutralise avec un dixième de cc. de soude normale. On répartit ensuite l'émulsion dans des tubes, par doses de un cc., et l'on ajoute le sérum comme dans la technique précédente. Il est parfois nécessaire d'augmenter la quantité d'acide chlorhydrique (de deux à cinq dixièmes de cc. pour vingt cc. d'émulsion suivant les échantillons).

2° TECHNIQUE D'AGGLUTINATION EMPLOYÉE PAR G. COOPER ET SES COLLABORATEURS

On part d'une culture de bouillon de bœuf ajusté à un pH de 7,6 à 7,8. Après un repiquage on opère sur une culture de dix-huit heures. Cette culture est éprouvée par sa solubilité en présence d'une solution de sels biliaires afin de détecter une contamination éventuelle. Suivant leur richesse les cultures sont diluées dans du sérum physiologique dans la proportion de 1 à 2, de 1 à 4 pour obtenir des suspensions plus claires. On mélange alors 0,5 cc. de culture diluée à 0,5 cc. de sérum dilué dans la même proportion. On laisse à l'éluve à 55° pendant deux heures (l'auteur insiste sur cette température optima de l'agglutination). Après deux heures une série de lectures est faite puis on met les tubes à la glacière pour la nuit. La lecture est faite à nouveau le lendemain matin ; les agglutinations se montrent plus fortes et plus faciles à lire qu'après les deux heures d'éluve à 55°. Dans les cas d'agglutinations croisées on parvient à l'agglutination prédominante par la méthode de l'agglutination-absorption.

3° MÉTHODE D'AGGLUTINATION-ABSORPTION (D'APRÈS G. COOPER)

Elle sert à déterminer le type de pneumocoque dans les cas d'agglutinations croisées (voir p. 28). Le culot de centri-

fugation d'une culture sur bouillon est recueilli dans du sérum physiologique et placé dans un tube gradué de 15 cc. On centrifuge à nouveau jusqu'à ce que les germes soient ramassés à l'extrémité du tube. Le liquide surnageant est décanté.

Les quantités de sérum qui doivent être ajoutées sont calculées de telle sorte que le volume du culot au volume du sérum soit de 1/5, 1/10, 1/20, suivant le titre du sérum qui doit être étudié. La quantité de sérum déterminée est ajoutée au culot.

On complète avec du sérum physiologique pour arriver à une dilution finale de une partie de dilution en sérum pour douze parties de solution saline. En calculant la quantité de sérum physiologique qui doit être ajoutée il faut déduire la quantité de sérum physiologique retenue dans les germes du culot. Elle est évaluée à la moitié du volume du culot.

Les microbes sont soigneusement émulsionnés dans les tubes qui sont laissés à l'étuve à 45°, pendant trois heures. Ils sont agités fréquemment pour permettre un contact plus intime des germes avec le sérum. Ils sont ensuite placés à la glacière pour la nuit.

Le lendemain on les centrifuge et les tests d'agglutination sont faits avec le liquide surnageant (sérum « absorbé ») ainsi qu'avec le sérum non absorbé pour contrôle.

4° PRÉPARATION DES SÉRUMS DE DIAGNOSTIC (SÉRUMS DE LAPIN) (1)

Des pneumocoques conservés en bouillon de cœur de bœuf phosphaté (0,2 p. 100) contenant du sang de cheval citraté à 3 p. 100, sont repiqués sur bouillon de cœur de bœuf phosphaté sans addition de sang et sont mis à l'étuve pendant 24 heures. De nouveaux repiquages sont faits en « bou-

(1) Lorsque nous nous servirons dans le cours de ce travail de l'expression « sérum de diagnostic » employée habituellement aux États-Unis et en Allemagne, on devra entendre les sérums de lapin hyper-immunisés, préparés et conservés selon la technique indiquée ci-dessous.

teilles » du même bouillon et sont laissés à l'étuve pendant 18 heures. Les cultures sont alors centrifugées et le sédiment est repris par une solution de formol à 5 p. 100 dans du sérum physiologique, dans des conditions telles que le sédiment provenant de 10 cc. soit contenu dans un cc. d'émulsion. Le vaccin ainsi préparé est gardé à la température du laboratoire pendant quatre ou cinq heures pour atténuer les germes, puis placé à la glacière jusqu'à l'emploi.

Les injections au lapin sont faites par voie intra-veineuse pendant trois jours consécutifs suivis de quatre jours de repos. Les quantités injectées pendant la première semaine sont de 1/4 cc., 1/2 cc., 1 cc. de vaccin. A partir de la seconde semaine, un cc. de vaccin est injecté chaque fois. Des saignées pour essais du sérum sont faites le troisième jour qui suit une série d'injections de manière que la vaccination ne soit pas interrompue si le titre du sérum est trop bas. La première saignée pour essai est faite après la douzième injection. Le titre minimum requis pour un sérum est tel qu'il doit agglutiner fortement la souche à partir de laquelle il a été préparé à la dilution d'au moins 1/200. Les lapins sont saignés du sixième au dixième jour qui suit la dernière injection.

Les sérums doivent être éprouvés par le test de Neufeld (ou test du gonflement de la capsule) sur les divers types de pneumocoques afin de s'assurer de leur spécificité et de l'absence de réactions croisées.

G. Cooper insiste sur les causes d'erreurs qu'elle a pu observer au début de ses travaux provenant de l'emploi indifférent des seringues au cours de la vaccination. Elle recommande de réserver une seringue à chaque type de pneumocoques pendant la préparation des sérums de diagnostic.

Le sérum de cheval *concentré* donne de bonnes agglutinations et de belles images de gonflement capsulaire mais il donne souvent des réactions entre les germes à agglutination croisée et est moins digne de confiance. La majorité des auteurs se servent autant qu'il leur est possible de sérum de lapin.

II. — Classification des pneumocoques

Park et Williams, en 1905, classent le streptococcus mucosus capsulatus comme une variété définie du pneumocoque (appelé ultérieurement pneumococcus mucosus), qui correspond au type III actuel.

Neufeld et Händel, en 1909, dans un mémoire remarquable, déterminent divers types de pneumocoques ayant pour caractère fondamental de n'être agglutinés que par le sérum homologue.

Cole et Hanes, en 1914, signalent l'existence d'agglutinations croisées pour certaines souches de pneumocoques.

Dochez et Gillespie, à la même époque, montrent qu'une partie des pneumocoques peut être divisée en deux groupes sérologiques distincts qu'ils appellent types I et II. Ils définissent le type III comme une variété morphologique distincte et placent les souches qui ne peuvent être classées parmi ces trois types dans un groupe d'espèces hétérologues appelé groupe IV.

Les recherches ultérieures tendent à démembrer le groupe IV en types distincts et à expliquer les cas d'agglutination croisée.

Avery, en 1915, classe dans un sous-groupe II des souches qui donnaient des agglutinations incomplètes ou retardées avec le sérum homologue et le divise d'après l'agglutination et les tests de protection en « sous-groupe II A » et « sous-groupe II B ».

Lister, en 1916, décrit un type de pneumocoque d'observation courante en Afrique du Sud, à propriétés sérologiques constantes, différent des types I, II, III, déjà connus.

Holmsted, la même année, étudiant 213 souches de pneumocoques par l'agglutination, établit une classification en douze groupes.

Clough, en 1917, étudiant 94 souches, les répartit également en douze groupes.

En France des travaux sont parallèlement poursuivis surtout par M. Nicolle et E. Debains qui résument, en 1919, les

résultats de leurs recherches en une note à l'Académie de Médecine : « Sur les races du pneumocoque avec remarques générales sur les antigènes ». Un grand nombre de pneumocoques de provenance variée sont étudiés systématiquement quant à leurs caractères d'agglutinabilité. Ils n'étudient que des échantillons solubles dans la bile. Parmi ces échantillons ils en trouvent 48 p. 100 immédiatement agglutinables, 45 p. 100 inagglutinables en apparence, s'agglomérant facilement après traitement par la méthode de Porge, 7 p. 100 se montrent hyperagglutinables (déjà sensibles au sérum équin normal). Ils se servent de sérums réactifs I, II, III, IV, dont les trois premiers se confondent avec les trois types américains correspondants, dont le quatrième représente un type spécial préparé à partir d'un pneumocoque isolé au cours d'une épidémie de pneumonie chez des troupes nègres. *Ils n'admettent donc pas comme type IV le groupe purement négatif des Américains* qui, pour eux, comprend des pneumocoques inagglutinables directement mais passibles d'agglutination par traitement chlorhydrique.

Voici comment ces sérums ont permis de classer la masse des pneumocoques étudiés :

PNEUMOCOQUES AGGLUTINABLES

Types purs (70 %) :

Echantillon I	1 %
Echantillon II	32 %
Echantillon III	59 %
Echantillon IV	8 %

Types mixtes (30 %) :

Echantillons I+I :

avec I dominant	64 %
sans dominance	9 %

Echantillons II+III :

avec II dominant	9 %
----------------------------	-----

Echantillons II+IV :

avec II dominant	9 %
----------------------------	-----

Echantillons I+II+IV :

(avec I et II dominants 9 %

PNEUMOCOQUES INAGGLUTINABLES

Types purs (91 %) :

Echantillon I 9 %

Echantillon II 82 %

Echantillon III 3 %

Echantillon IV 6 %

Types mixtes (9 %) :

Echantillons I+II :

II dominant 33,3 %

Echantillons II+IV :

II dominant 33,3 %

sans dominance 33,3 %

PNEUMOCOQUES HYPERAGGLUTINABLES

Echantillon II dominant 60 %

Echantillons II+IV dominants ... 40 %

Ils soulignent qu'il n'existe aucun rapport entre la race des pneumocoques et leurs autres propriétés, que si l'état muqueux ne se trouve lié qu'aux antigènes II ou III (purs ou associés) il n'affecte pas de relation avec l'inagglutinabilité ; enfin que tous les pneumocoques contiennent les quatre antigènes caractéristiques de l'espèce si on les étudie par la méthode de Bordet-Gengou. L'épreuve de l'agglutination révèle tantôt un seul antigène (type dit pur), tantôt plusieurs (type dit mixte) et les auteurs ne considèrent pas les races de pneumocoques comme des cadres absolument rigides.

Cotonj et ses collaborateurs reprennent en 1922 les conclusions de M. Nicolle et E. Debains, ils signalent en outre la possibilité de modification des propriétés antigènes d'une souche à quelques années d'intervalle ; c'est-à-dire qu'un type II primitivement pur se présente ultérieurement comme un II+I ; il rapproche ce fait de résultats similaires observés dans l'étude de l'immunité active et de l'immunité passive.

Pour eux, « les groupes constituent surtout des groupes d'agglutination » dont les frontières ne sont pas immuables. Un pneumocoque est un assemblage d'antigènes et le sérum peut répondre non seulement à l'antigène dominant, mais aussi aux antigènes accessoires. Ils ont observé chez l'homme qu'un sérum possédant un fort pouvoir préventif peut être actif à la fois vis-à-vis d'un type homologue et de certains types hétérologues : un certain nombre de pneumonies du type III ont été guéries par le sérum I et surtout le sérum II.

En France, à notre connaissance, aucune étude d'ensemble sur l'agglutination n'a été reprise depuis les conclusions précédentes jusqu'à ces derniers mois.

A la lumière des travaux ultérieurs ces conclusions ne semblent pas à l'abri de la critique. Nous avons vu les recherches modernes effectuées sur la structure chimique du pneumocoque et sur la substance spécifique hydro-carbonée de la capsule vectrice du pouvoir antigène ; on peut se demander si le traitement chlorhydrique d'une souche ne détermine pas des modifications chimiques essentielles susceptibles de la faire répondre à des anticorps hétérologues. Ainsi s'explique sans doute l'énorme proportion (45 %) de pneumocoques dits inagglutinables en apparence, devenant secondairement sensibles aux sérums I, II, III. Les résultats des divers expérimentateurs ne concordent pas avec les résultats ci-dessus ; en particulier les auteurs allemands et anglosaxons s'accordent à souligner l'action spécifique des sérums vis-à-vis d'une souche pneumococcique non seulement dans les expériences d'immunité active et passive sur l'animal, mais encore dans le traitement sérothérapique des pneumococcies humaines. Les points de contact entre les types de pneumocoques ont été longuement étudiés, les cas d'agglutination croisée sont rares, bien précisés. On peut y remédier par la méthode biologique simple de l'agglutination-absorption pour déceler le sérum à action prédominante, méthode qui n'offre pas et de loin les critiques que soulève la méthode de Porge. Les résultats cliniques favorables observés

après traitement par une sérothérapie non spécifique sont d'interprétation difficile ; bien d'autres facteurs que l'apport des anticorps du sérum peuvent entrer en jeu.

Les auteurs étrangers, bien qu'ils signalent les résultats obtenus par M. Nicolle et E. Debains, ne s'attachent pas à poursuivre leurs recherches dans la même voie. Ils continuent le démembrement de leur groupe IV ou X et isolent successivement de nouveaux types à caractères sérologiques spécifiques.

Griffith étudiant, en 1922, 49 souches n'appartenant pas aux types I, II, III, établit 12 types sérologiques nouveaux. Parmi eux les espèces correspondant aux sous-groupes II A et II B d'Avery prédominent.

Robinson, en 1927, classe 65 souches appartenant au groupe IV en 8 types différents.

C'est G. Cooper et ses collaboratrices M. Edwards, C. Rosenstein, A. Walter et L. Peizer qui, par une série de travaux remarquables, de 1928 à 1932, unifient la classification des pneumocoques en opérant sur des souches isolées de cas cliniques récents et sur des souches anciennes fournies par d'autres auteurs ayant travaillé l'agglutination. Dans un premier mémoire, en 1929, elles donnent les résultats d'une étude de 120 souches et réussissent à caractériser dix nouveaux types qui correspondent aux types IV à XIII. Elles ne peuvent classer dans ces dix types que 58 p. 100 des souches étudiées.

Dans un second mémoire, en 1932, elles donnent leur classification en *trente-deux types*, presque définitive, puisque *seulement 1,2 p. 100 des pneumocoques rencontrés ne peuvent rentrer dans cette classification*. Nous donnons ci-dessous une étude analytique des trente-deux types de pneumocoques, tels qu'ils ont été caractérisés par G. Cooper.

Le type I est le type le plus fréquent. Il détermine une pneumonie franche typique avec bactériémie fréquente. Sa structure chimique est connue. Il existe un sérum spécifique très actif dont l'emploi abaisse nettement le taux de la mortalité.

Le type II est le type le plus virulent. La bactériémie existe dans 42 % des cas. Ses constituants chimiques sont connus. Le sérum spécifique ne semble agir que dans les premiers jours et à doses élevées. Le taux de la mortalité est important. Des agglutinations croisées existent avec le type V.

Le type III est le moins fréquent des trois types classiques. Son caractère biologique essentiel est la production de mucus, sécrétion de sa capsule. Sa structure chimique est connue. Le sérum spécifique est le plus difficile de tous à préparer et c'est depuis peu de temps seulement qu'il existe un sérum concentré efficace. Il existe des agglutinations croisées entre les types III et VIII.

Le type IV (Pn. X de Griffith ; groupe IV B de Robinson) a été caractérisé par l'étude de 57 souches de pneumocoques isolées chez l'adulte au cours de pneumonies lobaires. Trente-quatre cas étaient sévères, vingt-trois modérés. Dix-neuf malades moururent parmi lesquels neuf avaient une hémoculture positive. Trois malades avec hémoculture positive guérirent. Un malade fit une méningite. Ce type IV fut également retrouvé dans six cas de pneumonie chez l'enfant, cinq d'entre elles furent bénignes, la sixième avec une hémoculture positive fut mortelle. Le type IV est un des types les plus fréquents de l'adulte et un des moins fréquents de l'enfant ; l'examen d'autres souches confirma les premières observations. La virulence est en général très grande pour la souris et la conservation des souches facile. On peut aisément préparer un sérum homologue de cheval de force variable, de 100 à 200 unités par cc. jusqu'à 800 et 1.200 unités selon le temps d'immunisation. Le test de protection sur la souris est uniformément bas, peut-être à cause de la grande virulence du germe pour cet animal ; néanmoins, les titres d'agglutination et de précipitation ne sont pas spécialement élevés. Sa structure chimique est connue.

Le type V (sous-groupe II A de Avery, Groupe IV E de Robinson) fut étudié sur 45 souches isolées de la pneumonie lobaire de l'adulte. Trente et un cas étaient graves, dix-neuf malades moururent, quatorze d'entre eux avec hémoculture positive. Cinq malades ayant une hémoculture positive guérirent. Ce type V fut également trouvé dans cinq cas de pneumonie lobaire chez l'enfant. Treize cas étaient d'intensité moyenne, les trois autres

très sévères. Deux enfants moururent dont un avec une hémoculture positive. Le type V est un type pathogène fréquent à la fois chez l'adulte et chez l'enfant. En culture, il a un pouvoir hémolytique plus grand que les autres types de pneumocoques. Il existe un sérum spécifique actif. Des agglutinations croisées existent avec le type II. Le type V est modérément virulent pour la souris. Il est de conservation difficile et le maintien de sa virulence exige de fréquents passages par la souris.

Le type VI a été isolé de vingt-six pneumonies de l'adulte, dix cas étaient graves, seize étaient d'intensité modérée. Cinq des sept malades qui moururent avaient une hémoculture positive. Ce type a été retrouvé dans vingt et un cas de pneumonie chez l'enfant ; cinq étaient graves, seize modérés ; deux enfants moururent. La virulence pour la souris est moyenne ; des passages sont nécessaires pour maintenir la virulence des cultures. Des sérums actifs ont été préparés.

Le type VII a été trouvé dans quarante-sept cas de pneumonie lobaire chez l'adulte ; vingt-six furent graves, dix-neuf d'intensité modérée. Sur douze morts, cinq cas avaient une hémoculture positive. Deux malades ayant des hémocultures positives guérirent. Le type VI a été également caractérisé dans deux cas de méningite purulente chez l'adulte. Il a été trouvé dans six cas de pneumonie chez l'enfant, un était grave, les autres d'intensité modérée. Ce type prédomine chez l'adulte. La virulence pour la souris est atténuée. Des passages fréquents sont nécessaires pour maintenir cette virulence. Les résultats de la sérothérapie sont favorables.

Le type VIII (groupe IV A de Robinson) a été isolé dans trente et un cas de pneumonie lobaire chez l'adulte : douze cas furent sévères, seize modérés, huit mortels. Cinq des sept malades qui eurent une hémoculture positive moururent. Deux cas de pneumonie furent compliqués de méningite. Ce type VIII a été trouvé dans trois cas de pneumonie chez l'enfant ; deux étaient légers, le troisième avec hémoculture positive entraîna la mort. La virulence pour la souris est considérable. Il existe des réactions d'agglutinations croisées entre les types VIII et III. Le type VIII n'a jamais d'enveloppe muqueuse. Un sérum concentré a été préparé.

Le type IX a été isolé dans seize cas de pneumonie lobaire chez l'adulte ; seize étaient graves, neuf modérés. Sept malades moururent dont deux avaient une hémoculture positive. Un malade ayant une hémoculture positive guérit. Ce type a été isolé dans trois cas de pneumonie lobaire chez l'enfant, deux cas étaient d'intensité moyenne, un enfant mourut. La virulence pour la souris est très faible. Un sérum concentré a été préparé.

Le type X a été isolé dans treize cas de pneumonie lobaire chez l'adulte dont deux étaient sévères, trois d'intensité moyenne. Six malades moururent dont deux avec hémoculture positive. Un malade ayant une hémoculture positive guérit. Le type X a été isolé au cours d'une méningite purulente. Il a été retrouvé dans deux cas de pneumonie lobaire chez l'enfant dont l'un fut bénin, l'autre mortel. Faible virulence pour la souris.

Le type XI a été isolé dans dix cas de pneumonie chez l'adulte dont quatre étaient graves et six d'intensité moyenne ; trois malades moururent. Un cas avec hémoculture positive resta modéré. Ce type a été isolé dans cinq pneumonies lobaires chez l'enfant, trois cas furent modérés, deux sévères dont un mortel. Virulence modérée pour la souris. Un sérum a été préparé.

Le type XII a été isolé dans douze cas de pneumonie lobaire chez l'adulte dont six sévères et six modérés : quatre moururent dont trois avaient une hémoculture positive. Il a été trouvé dans deux cas de méningite purulente. Il a été retrouvé dans deux pneumonies graves chez l'enfant. Virulence basse pour la souris.

Le type XIII a été isolé de quatorze cas de pneumonie lobaire chez l'adulte, sept étaient sévères, sept modérés. Trois malades, dont deux ayant une hémoculture positive, moururent. Ce type a été isolé d'un cas de pneumonie modérée chez l'enfant. Il est pour Webster un des types les plus fréquents chez les individus bien portants. Virulence très basse pour la souris.

Le type XIV est un des types les plus fréquents de la pneumonie de l'enfant. Il n'a été retrouvé que dans cinq cas chez l'adulte, trois de ces cas étaient graves, deux modérés. Deux malades dont un ayant une hémoculture positive moururent. Il a été retrouvé dans un cas de méningite purulente. Il a été isolé dans dix-neuf cas de pneumonie lobaire chez l'enfant dont sept graves

et douze modérés. Quatre enfants dont trois avec hémoculture positive moururent. Virulence modérée pour la souris.

Le type XV (pneumocoque 98 de Griffith) a été trouvé dans quatre cas de pneumonie lobaire chez l'adulte dont deux graves et deux modérés. Un malade ayant une hémoculture positive mourut. Ce type a été retrouvé dans sept cas de pneumonie lobaire chez l'enfant dont un grave. Virulence modérée pour la souris.

Le type XVI a été très peu rencontré ; deux cas chez l'adulte dont un avec hémoculture positive, deux cas chez l'enfant. Virulence peu marquée pour la souris.

Le type XVII a été isolé dans six cas de pneumonie chez l'adulte dont quatre graves et deux modérés ; deux cas furent mortels dont un avec hémoculture positive. Il fut retrouvé dans quatre cas de pneumonie chez l'enfant dont un grave. Virulence légère pour la souris.

Le type XVIII a été isolé dans douze cas de pneumonie lobaire chez l'adulte ; dix cas sévères, deux modérés, six cas avec hémoculture positive moururent. Ce type a été isolé de cinq méningites purulentes. Il a été retrouvé dans cinq cas de pneumonie chez l'enfant, dont un grave, les autres modérés. Virulence importante ou modérée pour la souris se conservant aisément. Agglutination croisée avec le type VII. Il a été préparé un sérum concentré.

Le type XIX a été isolé de six cas de pneumonie lobaire chez l'adulte dont cinq étaient graves et un modéré. Un malade qui avait une hémoculture positive mourut. Ce type a été isolé de sept pneumonies lobaires chez l'enfant ; trois cas étaient sévères, quatre modérés. Il a été trouvé assez fréquemment chez des sujets en bonne santé. Virulence modérée pour la souris.

Le type XX a été isolé de sept cas de pneumonie lobaire chez l'adulte, trois étaient sévères, quatre modérés, deux malades avec hémoculture positive moururent. Ce type a été retrouvé dans trois cas de pneumonie lobaire chez l'enfant, deux étaient graves, un bénin, un enfant mourut. Virulence variable pour la souris, en général modérée.

Le type XXI (pneumocoque 160 de Griffith) a été isolé de trois cas de pneumonie lobaire chez l'adulte, deux cas étaient sévères, un était modéré. Deux malades moururent dont l'un avait une hémoculture positive et une complication méningée. Ce type a été isolé dans un cas de pneumonie lobaire chez l'enfant. Virulence peu marquée pour la souris.

Le type XXIII (pneumocoque 41 de Griffith) a été isolé dans deux cas de pneumonie atténuée chez l'adulte. Il fut retrouvé dans deux pneumonies lobaires de l'enfant dont un grave. Griffith en Angleterre le trouva chez un certain nombre d'individus en bonne santé. Virulence élevée pour la souris tendant à disparaître rapidement. Un sérum a été préparé.

Le type XXIII a été isolé de sept cas de pneumonie lobaire chez l'adulte dont six graves et un d'allure modérée. Deux malades moururent dont un avait une hémoculture positive. Un malade avec hémoculture positive guérit. Ce type fut isolé de cinq cas de pneumonie chez l'enfant dont deux bénins et trois graves; un de ces derniers se termina par la mort. Il fut retrouvé chez un enfant au cours d'une méningite purulente. Virulence peu marquée ou modérée pour la souris.

Le type XXIV a été isolé dans sept cas de pneumonie lobaire de l'adulte, dont un cas mortel avec bacille de Friedländer dans le sang. Il fut isolé également dans le pus d'une méningite purulente, Griffith en Angleterre le trouva quelquefois chez des individus en bonne santé. Virulence modérée ou forte pour la souris.

Le type XXV fut retrouvé dans cinq cas de pneumonie lobaire chez l'adulte; deux malades ayant une hémoculture positive moururent. Trois cas avaient une allure modérée. Très haute virulence pour la souris.

Le type XXVI est sans commentaire.

Le type XXVII a été isolé de deux cas de pneumonie lobaire chez l'adulte, modérément graves. Il fut également retrouvé dans un liquide céphalo-rachidien, dans un abcès de l'amygdale, dans la gorge d'un rougeoleux. Virulence modérée ou très haute pour la souris.

Le type XXVIII a été isolé dans quatre cas de pneumonie lobaire chez l'adulte modérément graves. Virulence très variable pour la souris allant d'une faible virulence à une virulence élevée.

Le type XXIX a été isolé dans trois cas de pneumonie lobaire chez l'adulte; un cas fut mortel, deux furent graves. Il a été retrouvé dans trois cas de pneumonie lobaire de l'enfant d'allure bénigne. Virulence variable pour la souris, en général, élevée.

Le type XXX a été isolé de trois cas de pneumonie d'allure modérée chez l'enfant. Virulence élevée, modérée, ou avirulence pour la souris.

Le type XXXI fut isolé dans deux cas de pneumonie lobaire chez l'adulte, un cas était modéré, le second fut mortel. Virulence modérée pour la souris.

Le type XXXII (pas de renseignements sur les cas cliniques) a une virulence modérée pour la souris.

Tels sont les caractères des trente-deux types isolés. Vingt-quatre d'entre-eux ont une agglutination absolument spécifique. Les huit types restants forment quatre couples d'agglutinations croisées : agglutination entre les types II et V, entre III et VIII, entre VII et XVIII particulièrement aux sérums équins, enfin entre XV et XXX. Ces agglutinations croisées correspondent à des propriétés de protection croisée mais le sérum homologue reste de loin le plus actif. Dans ces cas, assez peu fréquents dans la pratique, la méthode de l'agglutination-absorption permet la détermination exacte du type et par là la sensibilité prédominante à un des deux sérums donnant l'agglutination croisée.

L'association de deux types différents de pneumocoques au cours d'une infection est très rare. Au cours de sa longue série de recherches, G. Cooper n'en a rencontré que quatre cas. Dans une telle éventualité la recherche des anticorps dans le sang pendant la convalescence apporte un complément au diagnostic.

L'étude de la répartition des types a donné les résultats

suivants : au cours des pneumonies lobaires de l'adulte, les types I, II, IV, V, VII et VIII sont le plus souvent rencontrés ; chez l'enfant ce sont les types V, VI, XIV et XIX ; chez l'adulte normal prédominance des types VI, XIII, XIV et XIX ; chez l'enfant normal le type VI serait le plus fréquent. Dans les cas de méningite purulente à pneumocoques le type XVIII a dominé.

En France, les expériences de caractérisation des pneumocoques n'ont donné lieu, croyons-nous, qu'au travail récent de Pochon qui étudie, à l'aide de sérums agglutinants de G. Cooper, 53 souches de pneumocoques isolées au laboratoire de M. Cotoni de novembre 1933 à avril 1936, germes recueillis sur des malades de la région parisienne. Les identifications ont été faites par la méthode du gonflement de la capsule de Neufeld et Etinger-Tuleczynska. Il donne les résultats suivants :

Type I	16	Type VIII	1
Type II	3	Type XVIII	4
Type III	7	Type XIX	1
Type IV	1	Type XXIII	1
Type V	1	Type XXVIII	1
Type VI	3	Type XXIX	1
Type VII	2		

Un certain nombre de souches n'ont pas été identifiées. Il ne signale pas d'agglutination croisée. Ses chiffres montrent qu'à Paris, si les groupes IV à XXXII prédominent dans les affections non pneumoniques, ils peuvent être trouvés dans des pneumonies authentiques (IV et VI).

En Allemagne, Neufeld et ses collaborateurs ont employé à leur tour les sérums de Cooper et ont abouti à des conclusions comparables. Ils soulignent la spécificité des sérums de diagnostic, le caractère exceptionnel des agglutinations croisées.

III. — Expériences personnelles

Elles ont porté sur l'agglutination à l'aide des 32 sérums diagnostics de G. Cooper.

Les premiers essais pratiqués avec les sérums I, II, III de l'Institut Pasteur nous avaient donné des résultats inconsistants (germes inagglutinables), contradictoires (mutation de pneumocoques?), et très souvent des agglutinations croisées malgré l'observation rigoureuse de la technique d'agglutination macroscopique de M. Nicolle.

Il n'en fut pas de même de nos essais ultérieurs. Chaque souche de pneumocoques étudiée a pu être aisément superposée à l'un des 32 types de la classification américaine et cette précision du type, quelle que soit la technique employée, agglutination microscopique, macroscopique, gonflement de la capsule, ne s'est jamais montrée douteuse dans le cours de nos expériences.

Nous ne nous étendrons pas sur nos résultats conformes aux publications étrangères ; nous désirons surtout souligner l'intérêt d'aborder systématiquement l'étude des pneumococcies d'après leurs aspects nouveaux.

Quelles que soient les critiques de microbiologie générale que peut soulever une telle répartition des pneumocoques en trente-deux types d'après leurs seules propriétés en présence d'un sérum homologue, on ne peut nier les fécondes déductions pratiques qu'en ont tiré les cliniciens étrangers. Pour les Américains la sérothérapie spécifique constitue le traitement de choix, dont ils ne voudraient se passer, des pneumopathies aiguës ; leur opinion est appuyée de statistiques toutes concordantes. Il n'est pas indispensable, d'ailleurs, de posséder trente-deux sérums thérapeutiques dès à présent, mais seulement les sérums correspondant aux pneumocoques pathogènes rencontrés dans la pratique. Les auteurs américains emploient actuellement dix-sept sérums curatifs.

CHAPITRE IV

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

Notre intention n'est pas de passer en revue les innombrables travaux relatifs à l'étude expérimentale des pneumococcies. Nous nous limiterons aux recherches surtout récentes pratiquées sur la souris blanche, « animal sensible ». Nous rappellerons les données acquises sur les inoculations sous-cutanées, sur l'inoculation péritonéale constamment employée à l'étranger, sur l'inoculation par voie aérienne qui a donné lieu à de nombreux travaux dans ces dernières années et sur laquelle nous nous étendrons plus longuement ; enfin nous exposerons les résultats de nos expériences personnelles sur la maladie expérimentale de la souris.

I. — L'infection de la souris par inoculation sous-cutanée

L'inoculation sous-cutanée est en France employée à l'exclusion de toute autre si l'on excepte quelques travaux disséminés. Maurice Nicolle et ses collaborateurs se sont tenus à cette voie d'inoculation pour l'étude du pouvoir pathogène du pneumocoque tel qu'il a été exposé par MM. Cotoni, Truche et Mlle Raphaël dans leur monographie de 1922. Ils se sont en fait limités à l'étude du titrage de la virulence d'un pneumocoque « au départ », c'est-à-dire à sa sortie de l'organisme malade, et à l'étude du pouvoir pathogène par passages chez l'animal ; ils ne signalent les autres renseignements que l'on peut tirer de la maladie expérimentale de la souris que pour en souligner la fragilité.

Le titrage de la virulence d'une souche pneumococcique est soumis à des conditions précises. On part de cultures en milieu T (24 heures à 37 degrés). Des doses variées sont injectées dans les muscles gastro-cnémien des souris. Si la dose dépasse un demi-centimètre cube on recommande l'inoculation sous la peau du dos, le liquide risquant dans le cas précédent de gagner le péritoine très proche.

Ainsi comprise la virulence « au départ » d'un pneumocoque se présente dans des conditions très variables.

Dans certains cas le pneumocoque tue la souris dans un délai variant entre une quinzaine d'heures et plusieurs jours. Le tableau anatomique est bien connu : septicémie, sang noir et dissous, présence de germes en nombre très variable selon les cas dans le sang et dans les viscères, en particulier dans la rate hypertrophiée et violette qu'on devra toujours examiner microscopiquement de préférence à tout autre organe. Les pneumocoques se présentent sous un aspect typique, lancéolés et encapsulés, parfois en courtes chaînettes. On confirme cette présence par une culture du sang du cœur et de l'encéphale. L'étude anatomo-pathologique parallèle à la progression de l'infection expérimentale ne semble avoir retenu l'attention qu'accessoirement.

La dose mortelle minima varie d'un échantillon à l'autre, de 10^{-11} cc. à 1 cc. Pour M. Cotoni et ses collaborateurs les pneumocoques peu virulents constituent la majorité.

Dans d'autres cas relativement fréquents la souris résiste à l'inoculation de cultures pures de pneumocoques. Aussi ces mêmes auteurs pensent que la sensibilité de la souris blanche a été fort exagérée par les classiques qui font de la souris blanche l'« animal réactif », la « pierre de touche » du pneumocoque, opinion très éloignée des faits.

Le titrage de la virulence doit être complété par l'inoculation intra-musculaire au lapin (poids moyen 2.000 gr.) et au cobaye (400 gr.). La dose de un centimètre cube injectée dans les muscles est prise dans ces cas comme unité de virulence.

L'inoculation directe à l'animal de produits pathologiques est formellement proscrite par l'école française. On lui reproche son infidélité pour l'isolement du pneumocoque et l'impossibilité de conclure pour le titrage de la virulence. En effet, on ne peut avoir aucune idée du nombre de germes inoculés, la virulence des échantillons isolés du sang du cœur est celle d'un microbe déjà modifié par l'organisme de la souris ; si l'animal résiste, on peut penser que les pneumocoques du produit pathologique étaient morts ou trop rares ou trop affaiblis pour tuer, on injecte en même temps que le

germe des substances « anti », enfin dans le cas fréquent d'un produit impur, les germes étrangers interviennent d'une façon impossible à apprécier dans l'évolution de la maladie expérimentale. Toutes ces raisons expliquent certains résultats paradoxaux : par exemple il n'est pas rare d'observer l'avirulence d'un pus pneumococcique alors que l'inoculation de ce même pneumocoque isolé par culture tue rapidement la souris. On conçoit que toutes ces inconnues déterminent le bactériologiste à condamner la méthode de l'inoculation directe.

L'étude de l'évolution de la virulence des pneumocoques au cours des passages *in vivo* a été longuement poursuivie par M. Cotoni et ses collaborateurs et les a conduits aux conclusions suivantes : « Il est possible d'augmenter la virulence du pneumocoque par des passages en série. Mais cette méthode est éminemment infidèle : l'échec est la règle, le succès la très grande exception. Alors même que la virulence augmente ou se maintient pour une espèce animale, elle peut baisser pour une autre, habituellement plus sensible cependant que la première. Les virulences artificielles que l'on obtient ainsi défient toute classification. Elles ne sont pas comparables à celles que l'on observe dans la nature et ce qui est vrai des unes peut ne point l'être des autres ».

Ajoutons encore un phénomène inexplicable actuellement : l'arrêt des passages avec certains échantillons, malgré toutes les tentatives employées pour renouer le fil de l'expérience.

En clinique, dans quelles circonstances a-t-on recours à l'inoculation sous-cutanée de la souris ? Elle constitue en général un simple moyen diagnostique en présence d'une pneumopathie atypique qui ne fait pas sa preuve. On se sert de l'inoculation directe d'un produit pathologique. C'est en réalité une méthode d'intérêt restreint ; outre les objections théoriques que nous venons de voir elle ne renseigne nullement sur le pouvoir pathogène d'un pneumocoque chez l'homme. On peut trouver un pneumocoque virulent au cours d'une affection bénigne ou même dans le pharynx d'un sujet en bonne santé. La présence d'un pneumocoque pathogène

pour l'animal ne renseigne pas sur la nature d'une pneumopathie ; par exemple, nous avons souvent rencontré un pneumocoque très virulent dans l'expectoration de malades atteints de tuberculose ulcéro-caséeuse chronique.

A l'étranger, l'inoculation sous-cutanée a été employée également pour l'étude du pouvoir pathogène du pneumocoque chez la souris, mais il est à remarquer qu'on trouve dans la littérature peu de documents fondés sur une technique rigoureuse ; beaucoup de travaux ont trait seulement à l'inoculation directe de produits pathologiques. Il ne semble pas qu'on ait cherché à se dégager le plus possible des causes d'erreur comme les bactériologistes français en ont eu le souci.

Actuellement l'inoculation sous-cutanée semble être une méthode de comparaison ou de contrôle qui cède le pas dans la pratique aux renseignements précieux que peut fournir l'inoculation intra-péritonéale.

II. — L'infection de la souris par inoculation intra-péritonéale

En France, à la suite de résultats contradictoires et d'interprétation difficile, M. Nicolle et ses élèves ont abandonné l'inoculation intra-péritonéale de pneumocoques. MM. Coton, Truche et Mlle Raphaël la négligent volontairement dans leur important travail parce qu'elle leur semble « particulièrement aveugle » chez un animal de petite taille.

A l'étranger, au contraire, l'inoculation péritonéale de produits pneumococciques est d'un emploi courant. En général cette voie d'inoculation se montre plus active dans le déterminisme de la septicémie pneumococcique et dans la rapidité de l'évolution mortelle. De ces avantages on ne tire pas de conclusions rigoureuses des points de vue bactériologique et virulence, mais un intérêt pratique pour le diagnostic rapide des pneumococcies. L'inoculation péritonéale en effet — et nous aurons à y revenir longuement à propos de nos recherches — détermine une pullulation des germes, une véritable culture de pneumocoques *in vivo* dans la cavité péritonéale

de l'animal, qu'il suffira de prélever par ponction ou sacrifice aseptique de l'animal pour une étude immédiate.

III. — L'infection de la souris par voie respiratoire

En France, l'infection pneumococcique de la souris par la voie respiratoire n'a pas donné lieu à des travaux importants.

Il n'en est pas de même à l'étranger où des études expérimentales ont été faites dans les douze dernières années. Les conclusions ne sont pas définitives, certaines demandent à être complétées (problèmes de l'immunité). Leur développement récent nous incite à nous y attarder plus longuement que sur les autres voies classiques d'inoculation.

Le but essentiel a été primitivement la reproduction de la pneumonie chez la souris. Les premières tentatives ont été infructueuses.

Whery et Butterfield, en 1921, ont montré que le pneumocoque pouvait être trouvé dans les parties les plus profondes des poumons de la souris dix-huit heures après la pulvérisation d'un nuage d'une culture de pneumocoques dans les voies respiratoires. Pas une des souris survivant à l'inhalation ne mourut de pneumococcie bien qu'il s'agit d'un pneumocoque type I très virulent.

Les premiers travaux systématiques sont ceux de Stillman. En 1923 il étudie la présence de pneumocoques dans les poumons de souris après inhalation de germes. Les animaux sont placés dans une boîte de fer galvanisée présentant une fente vitrée sur deux faces opposées, un arrivage d'air sur un des deux autres côtés est filtré par du coton, du côté opposé se trouve une ouverture par laquelle s'insère l'ajutage d'un pulvérisateur. Avant chaque expérience la boîte est stérilisée à l'autoclave. On pulvérise lors de l'expérience un nuage de 10 à 15 cc. de culture; dix à quinze minutes sont suffisantes pour remplir l'intérieur de la boîte d'un nuage lourd de fines gouttelettes. Les souris sont retirées une heure après la pulvérisation. Elles sont sacrifiées à des intervalles variés à par-

tir de l'inhalation ; pour éviter toute aspiration de germes de la partie supérieure à la partie inférieure des voies respiratoires, les souris sont tuées instantanément par écrasement du cou à l'aide d'une pince. La souris est immergée dans une solution de lysol et ouverte avec des instruments stériles. On fait des cultures à partir des organes, en particulier poumons, rate et sang du cœur. D'une série d'expériences portant sur 228 souris il résulte que le pneumocoque est présent dans les poumons des souris sacrifiées moins de deux heures après l'inhalation ; il est plus rarement rencontré au cours de la troisième heure, il n'est jamais retrouvé après ce délai. Sur un lot de 191 souris exposées dans les mêmes conditions, quatre seulement meurent d'une septicémie à pneumocoques du troisième au cinquième jour.

Stillman, l'année suivante, publie une série de résultats nouveaux. Il intoxique des souris soit par inhalation d'un brouillard alcoolisé, soit par l'injection intra-péritonéale de 1,5 cc. d'une solution d'alcool à 10 p. 100 en sérum physiologique. Il abandonne bientôt le premier procédé (mort rapide de souris). Il soumet ces souris intoxiquées aux mêmes conditions que précédemment. Il constate chez ces dernières la présence constante de pneumocoques dans les poumons pendant les vingt-quatre premières heures, avec culture positive du sang du cœur dans 16 p. 100 des cas. Sur un lot de 102 souris intoxiquées et exposées, 50 meurent dans un délai de 14 jours, chez 45 d'entre elles, soit dans 44 p. 100 des cas, la culture du sang du cœur est positive.

Stillman, la même année, produit un mémoire sur la production de l'immunité chez la souris par inhalation de pneumocoques. Il conclut à l'existence d'une immunité durable après dix inhalations dans 70 p. 100 des cas chez la souris normale, dans 77 p. 100 des cas chez les souris alcoolisées ayant résisté à la première inhalation habituellement meurtrière.

Dans un troisième mémoire de 1924, Stillman étudie la production expérimentale de la pneumonie par inhalation de pneumocoques. Il en tire trois conclusions : les souris non

immunisées et alcoolisées qui meurent de septicémie après inhalation ont rarement des localisations pulmonaires ; les souris partiellement immunisées puis exposées au pneumocoque présentent dans 60 p. 100 des cas des localisations pulmonaires évidentes et lorsque l'immunité est plus forte la proportion des lésions pulmonaires augmente dans les cas mortels ; l'immunité relative a un type ne protège pas fatalement la souris contre une infection pneumococcique d'un autre type, mais elle favorise le développement d'une localisation pulmonaire lobaire.

Lange, en 1924, nie la possibilité d'infection par inhalation chez la souris, même en employant des doses dix et cent fois mortelles. En 1925 il rapporte de nouveaux travaux au cours desquels il réussit à infecter mortellement des souris blanches dans 16 p. 100 des cas. Jamais il n'obtient de pneumonie expérimentale. Il pense que ce pourcentage si bas n'est pas dû à une diminution de la virulence du pneumocoque mais à sa disparition très rapide du poumon.

Eguchi, en 1925, dans des expériences d'inhalation, réussit à immuniser des souris contre des doses cent fois mortelles.

Brunzema, en 1931, démontre que des quantités minimales de pneumocoques virulents inhalés ne déterminent jamais d'immunité.

Webster et Clow, en 1933, étudient, avec une technique différente, la comparaison des virulences « intra-nasales » et intra-péritonéales pour une même souche. Leur méthode est une instillation nasale sans narcose. Ils déposent, à l'aide d'une seringue pourvue d'une aiguille à pointe émoussée, 0,003 cc. d'une culture de pneumocoques de 18 heures diluée au centième. Ils concluent que le degré de virulence intranasale des souches n'est pas parallèle à leur virulence intra-péritonéale dans 50 p. 100 des cas. Une haute virulence intranasale s'accompagne d'une virulence intra-péritonéale haute ou basse selon les cas. Une virulence intranasale basse s'accompagne d'une virulence intra-péritonéale variable, élevée, modérée, ou basse. Leurs expériences sont faites avec un certain nombre de types de pneumocoques. Les souches de

type I ont toutes une virulence basse par voie nasale tandis que la virulence par voie péritonéale est élevée ou modérée. Il en est de même pour les souches II. Les souches III ont des virulences intra-nasales et intra-péritonéales relativement élevées. Beaucoup de souches des autres types ont des virulences intra-nasales et intra-péritonéales basses.

Neufeld et Helga Kuhn, en 1935, publient une série de recherches sur la reproduction expérimentale de la pneumonie chez la souris par la voie respiratoire. Ils s'inspirent de la technique employée par Shope, puis par Andrews, Laidlaw et Smith dans leurs travaux sur l'augmentation de la réception des furets et souris à la fièvre porcine et à la grippe, c'est-à-dire l'anesthésie à l'éther avant l'infection des voies aériennes. Mais alors que Shope, après la narcose, plonge les narines et la gueule de l'animal endormi dans la culture liquide (l'animal prenant par l'inspiration 0,05 cc. à 0,3 cc. de culture), Neufeld pendant la narcose instille dans les narines le produit à étudier. Nous décrirons plus longuement cette technique à propos de notre expérimentation. Neufeld et H. Kuhn concluent que cette méthode est utilisée avantageusement lorsqu'il s'agit de provoquer chez la souris des maladies à point de départ pulmonaire, on obtient ainsi le plus souvent des pneumonies graves. Ceci est vrai pour le pneumocoque qui ne détermine que dans des conditions exceptionnelles des pneumonies expérimentales. Dans beaucoup de ces cas, l'inflammation pulmonaire était manifestement la cause immédiate de la mort. Les examens histologiques d'une pneumonie à pneumocoques XIX ont donné des images correspondant aux aspects de la pneumonie franche lobaire aiguë de l'homme. L'injection intra-pulmonaire de culture ne donne pas de résultats aussi constants que la voie nasale après anesthésie. La question reste posée de savoir si la narcose à l'éther, outre qu'elle facilite la progression du matériel infectant, n'a pas une influence propre sur le potentiel évolutif de la maladie expérimentale. Essayant d'autres facteurs irritants, ils montrent que la réceptivité de la souris n'est pas

modifiée par injection de nitrate d'argent ou de gaz lacrymogène dans les narines.

Neufeld et H. Kuhn, dans un nouveau mémoire en 1936, complètent leurs premières observations. Ils confirment que la narcose à l'éther augmente d'une façon essentielle le succès de l'infection nasale chez la souris, mais que l'action pathogène de cultures diluées à des taux croissants baisse rapidement. Comme Webster ils concluent à l'absence de parallélisme entre la virulence intra-nasale et la virulence intrapéritonéale ; ils se demandent s'il n'est pas nécessaire dorénavant en présence d'une souche donnée d'apprécier parallèlement la « virulence pulmonaire ». Dans des expériences d'immunisation par la voie respiratoire, ils confirment les résultats de nombreuses expériences sur d'autres espèces animales et avec d'autres germes, l'action directe de l'instillation de colorants (encre de Chine), de produits toxiques (toxine diphtérique), l'action de l'instillation simultanée de germes et de substances diverses, études qui dépassent le cadre de notre travail.

Exchaquet, en 1936, au laboratoire de Silberschmidt, reprend l'infection de la souris par inhalation de pneumocoques virulents. Il emploie d'abord la méthode de l'inhalation puis l'instillation nasale sous narcose. Alors que la première donne des résultats inconstants, variables avec les animaux et les souches, déterminant avant tout une septicémie (dans un seul cas il trouve une pneumonie bilatérale), au contraire la seconde détermine régulièrement l'infection mortelle de la souris. A la dose de 0,03 cc. de l'émulsion dans un cc. de sérum physiologique d'une culture sur gélose inclinée (dose plus élevée que celle de Neufeld), il observe avec grande fréquence des lésions pulmonaires allant de l'hyperhémie à la pneumonie. Dans une seconde série d'expériences l'auteur étudie la possibilité d'immunisation par inhalation de germes tués, de la fraction acido-soluble du pneumocoque, et conclut affirmativement.

Rake, en 1936, étudie la pathologie de l'infection pneumococcique de la souris après instillation nasale sans narcose

selon la technique de Webster et Clow. Il confirme la possibilité de déterminer une pneumonie chez la souris non préparée antérieurement (ni par immunisation ni par alcoolisation). Des lésions quantitativement différentes peuvent être produites selon les élevages de souris pour un même type de pneumocoque. Des inoculations de différents types chez des souris de même élevage produisent des lésions qui sont qualitativement différentes. En général, ces lésions sont les suivantes : pneumonie diffuse et néphrite glomérulaire accentuée chez des souris recevant des souches de type I, pneumonie confluente et néphrite tubulaire en cas de type II, pneumonie interstitielle avec pleurésie « gélatineuse » extensive, formation de nécrose et d'abcès dans la rate et les ganglions cervicaux en cas de type III. Si l'on infecte des espèces résistantes de souris avec le type III, les lésions sont peu marquées dans les poumons et très importantes dans la rate et les ganglions cervicaux. Le mode de développement de la pneumonie a été étudié pour le type III par des coupes histologiques en série. La succession des lésions a été la suivante : engorgement capillaire, exsudat interalvéolaire et interstitiel, exsudat albumineux fluide dans les alvéoles et les lymphatiques péri-vasculaires drainant le territoire atteint, pneumonie franche avec exsudat cellulaire dans les alvéoles mais sans beaucoup de fibrine.

Nous n'avons donné qu'un exposé succinct des recherches très étendues qui ont été faites sur l'infection pneumococcique de la souris par voie aérienne. Il est difficile après l'étude de ces travaux d'arriver à des déductions précises et concordantes. Cela n'est pas pour nous surprendre, la question est en remaniement constant comme en attestent les dates récentes des derniers travaux. De nombreuses causes expliquent les divergences de certains résultats : la diversité des voies d'inoculation employées : inhalation simple de Stillman ; instillation directe de Webster et Clow ; inhalation après narcose avec les variantes de Shope et Neufeld ; inoculation intra-pulmonaire ; les germes et les doses employés

sont très différents, aucun travail systématique (qui serait d'ailleurs considérable) n'a été fait.

Essayons cependant de dégager quelques points qui semblent définitifs :

1° la rareté de l'infection pneumococcique par simple inhalation. L'accord reste à faire sur les chiffres et le nombre des localisations pulmonaires.

2° l'instillation directe peut déterminer une infection à forme septicémique avec ou sans localisation pulmonaire. Les chiffres qui ont été donnés sont très différents.

3° l'instillation après narcose à l'éther entraîne une septicémie mortelle avec ou sans localisation pulmonaire dans un nombre de cas beaucoup plus grand qu'avec les méthodes précédentes. Le rôle de l'éther nous semble d'interprétation discutable. S'agit-il d'un rôle mécanique, l'anesthésie permettant une dissémination plus importante des germes dans l'arbre respiratoire ? S'agit-il du rôle irritant de l'éther sur la muqueuse pulmonaire dont la réceptivité se trouve augmentée ? Ces questions sont difficiles à trancher si l'on se souvient du rôle nul d'autres agents irritants et des localisations pulmonaires nombreuses obtenues par Stillman après alcoolisation de la souris par voie péritonéale.

4° la « virulence pulmonaire » n'est pas parallèle à celle des voies sous-cutanée et intra-péritonéale et mérite d'être plus souvent recherchée.

5° un certain degré d'immunité peut être obtenu contre l'infection pneumococcique.

IV. — Expériences personnelles sur la maladie expérimentale de la souris

Avant d'étudier les méthodes de diagnostic rapide des pneumococcies nous avons fait l'étude expérimentale de l'infection chez la souris. Elle en constitue la base. Nous avons trouvé l'explication de certaines défaillances des épreuves proposées et certains moyens d'y remédier. En outre l'analyse minutieuse de l'évolution des pneumococcies nous a

révélé l'existence d'une infection chronique ou latente à localisation cérébrale élective chez certains de nos animaux, notion intéressante de pathologie générale que nous n'avons pas vue signalée.

Nous exposerons dans une première partie les techniques que nous avons employées, dans une seconde partie les modalités évolutives de l'infection expérimentale que nous avons observées : septicémie rapidement mortelle, pneumococcie prolongée, guérison.

A. — Techniques employées.

1° NATURE DES PRODUITS MICROBIENS INOCULÉS. — Au cours de nos expériences nous avons injecté les souches pneumococciques les plus diverses :

a) des cultures de dix-huit à vingt-quatre heures en bouillon Truche, repiquées à partir de souches pneumococciques conservées au laboratoire en gélatine ou à partir de germes isolés chez l'homme par culture directe ou par l'intermédiaire de l'animal ;

b) des émulsions de crachats en sérum physiologique ;

c) du pus pleural ou méningé ;

d) hémocultures provenant de septicémies humaines ;

e) viscères ou cerveaux de souris infectées, broyés en sérum physiologique ;

f) liquide de tubage gastrique chez des nourrissons atteints de pneumococcie pleuro-pulmonaire.

Au total, nous avons expérimenté sur 81 souches pneumococciques différentes, chaque souche ayant fait l'objet de plusieurs séries d'expériences. Nous avons évidemment choisi les souches microbiennes conformément au but poursuivi : produits pathologiques de la clinique journalière lorsqu'il s'est agi de recherches essentiellement pratiques, cultures pures identifiées et conservées aux laboratoires de l'Institut Pasteur, lorsqu'il s'est agi d'établir des faits scientifiques rigoureux.

2° MODES D'INOCULATION. — Le plus souvent le produit inoculé était suffisamment fluide pour une inoculation directe. En cas de crachats pneumoniques compacts qu'il était impossible d'injecter sans préparation nous avons fait une émulsion en boîte de Petri stérile avec un minimum de sérum physiologique. Quand il s'est agi de passages de souris à souris, nous avons broyé l'organe en mortier stérile et inoculé le « suc » obtenu.

En dehors des expériences assez rares où nous avons eu besoin de titrer la virulence d'un pneumocoque, nous avons de façon constante inoculé nos animaux avec 2/10 de centimètre cube du produit pneumococcique étudié. Ce chiffre relativement faible a l'avantage lorsqu'il s'agit d'inoculations intra-péritonéales ou nasales de ne pas inonder l'organe par une trop grande quantité de liquide et d'inoculer une quantité de corps microbiens pas trop considérable.

Les inoculations sous-cutanées ont été faites à la racine de la queue ou à la base d'une patte postérieure dans les muscles gastro-cnémiens.

Les inoculations intra-péritonéales demandent certaines précautions que nous croyons utiles de souligner : la souris doit être fixée par une pince de Kocher mise sur la nuque d'une part et accrochée à un point fixe d'autre part, un aide maintient ses pattes postérieures en exposant sa face centrale, les téguments de la paroi abdominale sont soulevés par une pince à disséquer ; l'aiguille est enfoncée obliquement au sommet du pli ainsi formé et poussée de un demi-centimètre environ : on ne risque pas ainsi de léser l'intestin ou le foie.

Les inoculations par voie nasale ont été pratiquées selon la méthode de Neufeld : instillation nasale de pneumocoques pendant la narcose. La souris est placée avec un tampon d'ouate imbibé d'éther sous un verre à expérience. L'anesthésie est réalisée en quelques minutes (trois à cinq en moyenne), mais ce temps est variable et la marge dangereuse est rapidement dépassée ; c'est dire qu'il faut soigneusement surveiller l'animal et commencer l'instillation

peu après le début du sommeil marqué par l'affaissement de la souris. On la saisit de façon qu'elle repose légèrement inclinée sur le dos dans la paume de la main gauche, le pouce et l'index la maintenant par la nuque. Au moyen d'une seringue de Barthélémy munie d'une aiguille mousse on instille lentement 2/10 de cc. de culture en déposant alternativement sur chaque narine de très petites quantités qui se trouvent inhalées de suite par le jeu de la respiration sous anesthésie sans l'intervention d'aucun réflexe. Assez souvent la souris se réveille avant que l'opération ne soit terminée (nous faisons l'instillation très lentement, en 15 à 20 minutes) et il est nécessaire de l'anesthésier à nouveau légèrement à plusieurs reprises. Une surveillance minutieuse des divers points de l'expérience rend minime la perte accidentelle des animaux.

3° SACRIFICE DES SOURIS : ÉTUDE BACTÉRIOLOGIQUE ET ANATOMIQUE. — Au cours de nos expériences nous avons sacrifié nos souris par inhalation d'éther (tampon de coton hydrophile largement imbibé) sous un verre à expérience. Immédiatement après la mort de la souris ou au cours de son anesthésie profonde on en pratiquait l'autopsie le plus aseptiquement possible. La souris épinglée face dorsale sur du liège, on imprégnait largement de teinture d'iode l'abdomen et le thorax avant l'ouverture avec des instruments stériles. Parfois même la souris était imbibée d'alcool sur toute sa surface et « flambée » pendant quelques secondes. Les mêmes précautions étaient employées lorsqu'il s'agissait d'extérioriser le cerveau de la souris après fixation sur sa face ventrale. La plupart de nos séries d'expériences ont comporté le sacrifice de souris d'heure en heure pour observer l'évolution de l'infection et les réactions organiques.

Nous avons étudié :

a) *les réactions péritonéales*, surtout intéressantes dans le cas d'inoculations intra-péritonéales, mais aussi dans les cas d'inoculations sous-cutanées et nasales. Nous avons suivi les phénomènes pathologiques microbiens et cellulaires

du péritoine au cours de l'infection pneumococcique en faisant des sacrifices successifs de souris inoculées avec un même produit dans les mêmes conditions. Les prélèvements intra-péritonéaux ont été faits sur la face antérieure du psoas en réclinant la masse intestinale. Il existe habituellement un léger exsudat péritonéal permettant l'aspiration à la pipette de quelques gouttes de sérosité ;

b) *l'évolution de l'envahissement microbien du sang.* Le thorax de chaque souris ouvert aseptiquement mettait à nu le cœur. Une fine spatule rougie servait à cautériser un point de l'organe. Par cette zone on enfonçait une pipette Pasteur et on aspirait une petite quantité de sang qu'on ensemençait en bouillon T. La même opération était répétée à des horaires différents pour suivre l'évolution des germes ;

c) *l'envahissement microbien des viscères ou au contraire l'absence d'envahissement* par examen de frottis des divers organes : rein, rate, foie, poumon, cerveau et selon les cas par culture en bouillon T de ces mêmes viscères au cours des sacrifices échelonnés de nos souris. Lorsque l'inoculation est faite intra-péritonéale, la présence de pneumocoques dans la cavité péritonéale, où baignent les viscères, constitue une cause d'erreur lors de l'autopsie. La même cause d'erreur existe d'ailleurs, mais moins patente, lorsqu'une inoculation sous-cutanée est suivie de septicémie avec péritonite. Nous avons essayé de réduire au minimum ces inconvénients en lavant les organes en sérum physiologique et en employant un fragment central pour faire les frottis et les cultures ;

d) *l'altération anatomique des viscères* a été étudiée dans certaines expériences. Les organes ont été fixés en solution de Bouin ou de Zenker ;

4° SOURIS INOCULÉES MORTES SPONTANÉMENT. — ETUDE BACTÉRIOLOGIQUE ET ANATOMIQUE. — Dans chacune de nos expériences, nous avons laissé évoluer l'infection chez deux souris, l'une inoculée par voie péritonéale, l'autre par voie

sous-cutanée. Dans les cas où le produit suffisamment virulent entraînait la mort de nos animaux, nous nous sommes efforcé de préciser l'horaire de la mort selon la voie d'inoculation. Nous avons pratiqué comme pour les souris sacrifiées un examen systématique de la réaction péritonéale ; un examen des viscères, tant par frottis que par culture ; enfin une étude des lésions anatomiques des divers organes. Dans les cas où l'autopsie a pu être faite immédiatement après la mort, ces examens ont été pratiqués dans des conditions satisfaisantes anatomiquement et bactériologiquement si l'on excepte certaines surinfections vraisemblablement agoniques que nous avons rencontrées. Au contraire, si l'autopsie était faite plus tardivement, le péritoine était asséché et le frottis ne pouvait être obtenu qu'en raclant la séreuse avec un fil de platine, l'envahissement des viscères par des germes de putréfaction était constant, précoce, et rendait l'étude microbienne impossible. Le cerveau seul est envahi plus tardivement et bien souvent son ensemencement nous a donné une culture pure de pneumocoques alors que les cultures des viscères et du sang étaient souillées. C'est un point de technique assez précieux sur lequel insistait Maurice Nicolle, valable pour toutes les infections expérimentales qui nous a rendu service à de nombreuses reprises. L'étude anatomique n'a été faite que dans un petit nombre de cas puisqu'on avait la possibilité de sacrifier des souris dans les mêmes conditions avant d'attendre les altérations agoniques et cadavériques.

5° IDENTIFICATION DES PNEUMOCOQUES. — Outre l'étude morphologique de nos prélèvements microbiens par examen direct entre lame et lamelle, après colorations de Gram et au bleu de méthylène (solution alcaline standard) nous avons employé :

a) les cultures en bouillon T de pH bien ajusté à 7,6-7,8 après stérilisation, et en eau peptonée pour comparer la facilité et la vitesse des cultures. Dans les cas difficiles ou justiciables d'une identification rigoureuse les caractères de

culture ont été étudiés sur gélose T, sur milieux au sang, sur milieux à l'insuline que le pneumocoque a la propriété de coaguler et de faire fermenter. Aucun de ces caractères de culture n'est absolument rigoureux ;

b) la lyse par les sels biliaires (phénomène de Neufeld) que nous recherchons de la façon suivante : 1 cc. de culture en bouillon T de dix-huit à vingt-quatre heures est additionné de trois gouttes d'une solution aqueuse de sels biliaires purs à 5 %. La réaction est totale en trois minutes dans le cas de pneumocoques virulents. L'épreuve peut être négative en présence de souches avirulentes ;

c) la recherche de l'agglutination spécifique par les sérums homologues de cheval nous a paru très aléatoire tant que nous n'avons eu à notre disposition que les sérums habituellement employés en France. Malgré l'application rigoureuse de la technique de M. Nicolle pour l'agglutination macroscopique nous avons obtenu des résultats souvent déconcertants. Certes, certaines souches se révélaient comme appartenant manifestement aux types I ou II, exceptionnellement III, mais nous avons rencontré très fréquemment des agglutinations croisées et comme nous avons éliminé la méthode de Porge de nombreuses souches se sont montrées inagglutinables. *A fortiori* la méthode microscopique consistant à mettre en contact entre lame et lamelle une goutte de culture de dix-huit heures et une goutte de sérum est sujette à caution par la complexité des résultats obtenus. Nous avons même observé la mutation apparente de certains types de pneumocoques (type I en type II) que nous n'avons pas voulu retenir après les résultats obtenus en recherchant l'agglutination par les 32 sérums de diagnostic du laboratoire de G. Cooper que M. Cotoni a eu la grande obligeance de nous prêter.

Dans ces nouvelles conditions l'agglutination apparaît non seulement comme un moyen d'identification excellent mais encore permet de préciser le type du pneumocoque. Nous avons employé l'agglutination macroscopique selon la technique de M. Nicolle (nous ne nous sommes pas encore

servi de celle de G. Cooper) et plus souvent l'agglutination microscopique qui non seulement montre l'agglutination dans le cas d'un exsudat péritonéal suffisamment riche en germes mais permet encore d'observer le gonflement de la capsule, spécifique du type.

d) Enfin, des tests de virulence, des repiquages successifs avec réinoculation à la souris ont été employés pour la confirmation de diagnostics hésitants ou l'étude de la conservation du pouvoir pathogène au début de chaque série d'expériences.

B. — Les modalités évolutives de l'infection pneumococcique expérimentale de la souris.

Nous avons déjà souligné la fréquence des inoculations de pneumocoques qui ne sont pas suivies de la mort de l'animal. Dans l'ensemble nous avons expérimenté aussi souvent sur des souches qui se sont révélées virulentes que sur des souches avirulentes. Nous distinguerons trois modalités évolutives de l'infection expérimentale : la septicémie pneumococcique mortelle, la pneumococcie prolongée de la souris à détermination cérébrale que nous avons mise en évidence, enfin la guérison.

1° LA SEPTICÉMIE PNEUMOCOCCIQUE MORTELLE

Nous l'avons étudiée après les inoculations par les voies sous-cutanée, intra-péritonéale, respiratoire.

a) Souris inoculées par voie sous-cutanée

La septicémie pneumococcique entraîne la mort de la souris dans un temps assez peu variable, 18 heures à 84 heures, ainsi qu'il ressort de l'inoculation d'environ 200 souris. Les évolutions plus prolongées sont rares ou rentrent dans le cadre des pneumococcies prolongées de la souris que nous envisagerons plus loin. A mesure que se développe l'infection on voit survenir chez la souris des modifications

qui sont intéressantes à connaître. Elles permettent de la sacrifier avec la certitude qu'il s'agit d'une souris malade et sans les causes d'erreur résultant de surinfections agoniques ou cadavériques. La souris ne mange plus, perd son activité, se recroqueville le dos rond en un point du bocal qu'elle ne quitte plus ou seulement avec peine, ses poils se hérissent, ses yeux se ferment et se recouvrent dans certains cas d'un léger exsudat séro-purulent. Ces symptômes apparaissent en moyenne de trois à six heures avant la mort et s'accroissent rapidement. Nous n'avons vu qu'exceptionnellement un abcès se développer au point d'inoculation.

L'étude de l'infection a comporté :

- L'étude de la progression de la dissémination des germes dans l'organisme au moyen d'hémocultures en série ;
- L'examen de frottis d'organes en série ;
- L'étude anatomo-pathologique des viscères.

Nous avons sacrifié les souris pour une telle étude à la première, deuxième, troisième, cinquième, septième, dixième, quinzième, vingtième heure et nous avons laissé évoluer spontanément la maladie chez deux souris dans chacune des séries.

Nos observations sont les suivantes :

L'hémoculture devient positive de la troisième à la cinquième heure et reste positive jusqu'à la fin dans tous les cas que nous avons étudiés.

La mise en évidence de pneumocoques dans les viscères et dans le sang du cœur reste négative jusqu'à la vingtième heure en moyenne, jusqu'à cette heure les pneumocoques trouvés sont isolés dans tel ou tel viscère sans fréquence élective. A partir de cette heure les germes sont de plus en plus nombreux dans les organes, pour atteindre leur maximum au moment de la mort. Le nombre des germes par champ microscopique reste en général modéré : souvent limité à quelques unités ou même moins encore, un pneumocoque pour plusieurs champs ou pour de nombreux champs. Nous soulignons l'intérêt d'étudier la sérosité péritonéale, son ensemencement septicémique est contemporain

de celui des organes mais dans les cas où les pneumocoques se montrent rares dans les viscères la sérosité péritonéale par sa richesse est de lecture beaucoup plus facile.

Anatomiquement les lésions présentent leur maximum dans le foie ; dès la deuxième heure apparaît une congestion importante avec turgescence des cellules de Kupffer, mais sans lésions épithéliales ; dès la cinquième heure les lésions sont considérables, on note une disparition presque totale de l'espace intertrabéculaire, une vacuolisation cellulaire avec quelques noyaux en pycnose ; à la dixième heure elles sont à leur maximum, il existe une dégénérescence granuleuse et vacuolaire des cellules parenchymateuses, les noyaux sont détruits ; on rencontre parfois de petits abcès à polynucléaires. La rate est beaucoup moins altérée ; dès la deuxième heure il existe une petite congestion diffuse qui croît progressivement ; à la dixième heure apparaît une hyperplasie des éléments cellulaires mobiles, des macrophages ; progressivement se développe une dislocation de la trame réticulaire ; dans certaines coupes on peut voir, au voisinage de la mort, des foyers de nécrose hémorragique. Les poumons restent peu atteints pendant toute la durée de l'évolution, on n'y trouve qu'une congestion interalvéolaire ; dans un cas nous avons observé une image d'infarctus pulmonaire. Les reins sont atteints assez tardivement, de la deuxième à la septième heure s'installe une congestion vasculaire puis glomérulaire, de la septième à la vingtième heure quelques discrètes traînées inflammatoires interstitielles sans lésions épithéliales apparaissent ; c'est seulement au voisinage de la mort que les lésions sont importantes : flocculus glomérulaire, petits foyers de nécrose avec éléments inflammatoires, traînées inflammatoires interstitielles, dans certains cas images d'infarctus par embolus septique.

En résumé, septicémie rapide classique, avec maximum et précocité des lésions dans le foie au point de vue anatomique. Nos expériences nous ont montré la discrétion, la rareté ou même l'absence apparente de germes dans certains cas lorsqu'on examine les frottis des différents viscères et du

sang du cœur; nous recommandons dans ce cas de pratiquer systématiquement la recherche des pneumocoques dans la sérosité péritonéale où ils sont plus nombreux. La voie sous-cutanée reste la voie de choix pour l'étude d'une virulence.

b) Souris inoculées par voie péritonéale

C'est dans la règle un mode d'inoculation plus meurtrier et d'évolution plus rapide. Son intérêt essentiel est la pullulation des pneumocoques dans la cavité péritonéale réalisant en quelques heures une véritable culture *in vivo*.

La septicémie après injection intra-péritonéale d'un produit pneumococcique virulent est mortelle en 12 à 48 heures; dans la majorité des cas la mort survient dans les vingt-quatre premières heures, comme il ressort de l'inoculation par voie péritonéale d'environ 650 souris. Le « tableau clinique » est celui que nous avons vu à propos des injections sous-cutanées. Mais les signes sont plus précoces. Parfois la souris est choquée dès la première heure et ne recouvre à aucun moment une apparence normale.

Les résultats que nous avons obtenus en suivant la technique indiquée plus haut seront groupés sous quatre chefs :

- Etude de la bactériémie d'heure en heure ;
- Etude de l'exsudat péritonéal de souris sacrifiées d'heure en heure ;
- Envahissement progressif des viscères par les pneumocoques ;
- Etude anatomique des lésions.

1) *Etude de la bactériémie d'heure en heure.* — Dans toutes les séries d'expériences où nous avons fait cette recherche, c'est-à-dire lorsqu'il s'agissait de pneumocoques virulents, l'hémoculture s'est toujours montrée positive dès la première heure et pendant toute l'évolution attestant la brutalité de l'infection par cette voie d'inoculation.

2) *Etude de l'exsudat péritonéal de souris sacrifiées d'heure en heure.* — Cette étude a porté sur trois points : l'exsudat macroscopique, la cytologie, la pullulation des pneumocoques.

L'*exsudat macroscopique* est habituellement peu abondant : quelques gouttes tout au plus de liquide séreux légèrement opalescent peuvent être aspirées à la pipette pour étalement sur lame. Exceptionnellement on doit se contenter de passer le fil de platine sur la séreuse.

Dans des cas très peu nombreux l'exsudat péritonéal était très abondant sans qu'on puisse en trouver l'explication, variant d'une souris à l'autre dans une même série.

Sept fois (souris 24, 128, 166, 174, 220, 458 et 459) il existait véritablement une péritonite purulente avec fausses membranes. L'une des souris, sacrifiée à la troisième heure, avait été inoculée avec du pus de pleurésie purulente métapneumonique. L'autre, sacrifiée à la cinquième heure, avait été inoculée avec des crachats d'abcès du poumon. La troisième, sacrifiée à la quatrième heure, avait été inoculée avec des crachats de congestion pulmonaire post-anesthésique. La quatrième, sacrifiée à la cinquième heure, avait été inoculée avec des crachats du malade précédent recueillis quatre jours plus tard. La cinquième, sacrifiée neuf jours après inoculation de crachats pneumoniques prélevés cinq jours après la défervescence, présentait un abcès péritonéal enkysté. La sixième et la septième, sacrifiées respectivement à la vingt-quatrième et à la vingtième heure, avaient été inoculées avec les crachats d'un malade présentant une pneumopathie prolongée.

La *cytologie* de l'exsudat péritonéal varie en qualité et en richesse.

Qualitativement on peut observer, isolés ou associés, des globules rouges, des polynucléaires, des lymphocytes, des monocytes, des cellules endothéliales. Ces éléments sont plus ou moins altérés suivant les cas.

Numériquement leur abondance est variable : parfois réduite à quelques unités, ils se présentent ailleurs en grand nombre.

La qualité de la réaction cytologique et son abondance ne permettent en rien de présumer de la virulence du pneumocoque vis-à-vis de la souris.

Pour mieux étudier la morphologie des éléments cellulaires, nous avons été conduit à faire non seulement des colo-

ractions par la méthode de Gram, mais encore des colorations au bi-éosinate de Tribondeau.

Dans un assez grand nombre de cas, on observe des images de phagocytose. Sans doute convient-il d'être prudent avant de les affirmer. On doit, en effet, faire la part des images trompeuses résultant de la superposition sur le frot-tis de pneumocoques et de cellules. Mais il est des images qui emportent la conviction quand on voit par exemple, des pneumocoques groupés autour d'éléments cellulaires et, en d'autres endroits, des germes dont la capsule nettement visible, tranche sur le cytoplasme du phagocyte plus ou moins altéré

La pullulation des pneumocoques injectés dans le péritoine doit être étudiée dans son horaire, son abondance, l'aspect des germes, leur évolution.

Le développement horaire des germes commence parfois très précocement dès la première ou la deuxième heure qui suit l'inoculation. La pullulation devient maxima entre la troisième et la sixième heure. Fréquemment même l'abondance des germes croît d'heure en heure jusqu'à la mort spontanée des souris de la même série. Mais le fait, nous le verrons, n'est pas constant.

L'abondance des germes ainsi développés est variable au début. Tantôt elle reste faible (Fig. 1), moins de 10 germes par champ microscopique) ou moyenne (Fig. 2) (10 à 50 germes) pendant les premières heures. Finalement elle devient d'une richesse prodigieuse qui déconcerte l'œil au premier aspect : les pneumocoques sont tellement nombreux qu'ils sont tassés les uns contre les autres, véritablement incomptables (Fig. 3).

L'aspect des germes, lui non plus, n'est pas absolument constant. Sans doute la forme la plus typique est-elle constituée par le diplocoque lancéolé, en « flamme de bougie » encapsulé et Gram positif. Mais il est possible, comme dans les cultures d'ailleurs, de trouver de courtes chaînettes encapsulées, un peu rigides, au sein desquelles on devine une constitution diplococcique. Dans d'autres cas, surtout si la

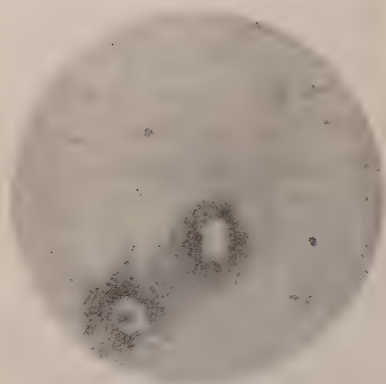


Fig. 1.

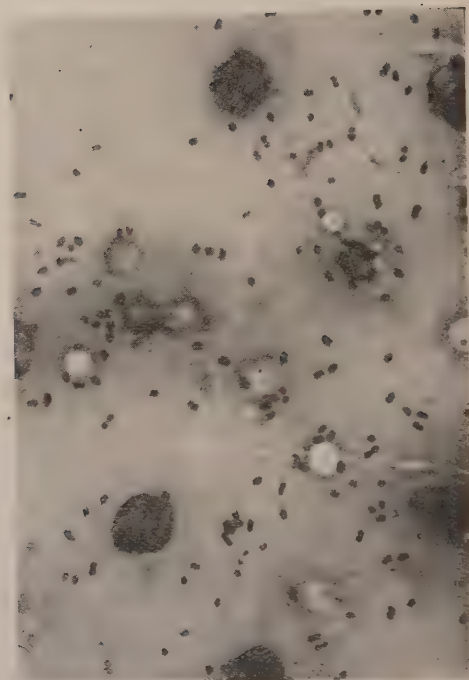


Fig. 2.



Fig. 3.

L'ÉCRIVE DU PÉRITOINE DE LA SOURIS.

Trois souris sont inoculées dans la cavité péritonéale avec 2 10 de centimètre cube d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures (pneumocoque 16).

Les frotis de la sérosité péritonéale prélevée à la première heure (fig. 1), à la troisième heure (fig. 2), à la septième heure (fig. 3) montrent la pullulation croissante des germes et leur abondance étonnante à la septième heure. (Coloration de Gram.) [Photomicrographie Ardoine 1/1200]

prolifération s'est faite suivant un rythme très accéléré, on voit certains éléments cocciformes arrondis ou ovalaires.

Nous retrouvons donc ici la grande loi générale de bactériologie qui interdit de borner l'identification d'un germe à son aspect morphologique.

L'évolution des pneumocoques injectés dans le péritoine de la souris se fait selon les modalités évolutives suivantes dans le cas de septicémie mortelle :

— dans un premier groupe de faits, les plus fréquents, on assiste à une pullulation intense, progressive et rapide des germes, comme si les défenses locales de la souris étaient sidérées par l'agression microbienne (Fig. 1, 2 et 3) ;

— dans un second groupe de faits on semble assister à une lutte entre les pneumocoques et les éléments phagocytaires, lutte d'ailleurs de courte durée (trois, quatre ou cinq heures) à l'issue de laquelle on constate, sur les frottis péritonéaux, une disparition des éléments cellulaires, puis une pullulation retardée des germes (souris 167, 252, 255, 660, 668) ;

— dans un troisième groupe de faits l'avantage tourne, momentanément du moins, en faveur de la défense péritonéale, le champ de bataille est nettoyé des germes agresseurs (souris 128, 129, 228, 231, 410, 458) : pas de pullulation microbienne. Quelle sera l'évolution ultérieure une fois passées les huit à neuf premières heures ? Souvent, ce nettoyage du péritoine n'est pas un test de guérison, la septicémie va éclater un peu plus tard.

Un exemple, entre autres, nous en est fourni par 5 souris (297 à 301) inoculées dans le péritoine le même jour, à la même heure avec le même crachat pneumonique. Les trois premières souris (297 à 299) sont sacrifiées respectivement à la deuxième, troisième et quatrième heure. Nous assistons dans l'exsudat péritonéal à un développement d'ailleurs modéré des germes injectés : c'est ainsi qu'à la quatrième heure, nous comptons 10 à 15 pneumocoques par champ. La souris 300, sacrifiée à la sixième heure, ne contient plus de germes dans son péritoine. La souris 301 meurt spontanément quarante-huit heures après l'inoculation. Son

péritoine renferme une culture pure de pneumocoques avec une cytologie extrêmement réduite.

Rapprochant cette abondance des germes dans le péritoine de la souris 301 de leur absence dans le péritoine de la souris 300, on peut dire que, dans des cas analogues, tout se passe comme si la maladie expérimentale se déroulait en deux phases : une première phase de pullulation péritonéale locale, avec guérison locale mais passage de pneumocoques dans la circulation générale; une deuxième phase de réensemencement secondaire du péritoine par voie septicémique.

Tels sont les trois « films » péritonéaux possibles, de la pneumococcie aiguë mortelle après injection intra-péritonéale.

3) *Envahissement progressif des viscères par les pneumocoques.* — Dans les deux premières heures, on ne trouve pas ou très peu de germes dans le sang du cœur et dans les divers viscères. De la cinquième à la septième heure on constate dans le sang et dans les organes des pneumocoques peu nombreux mais dont le nombre tend à croître. A partir de la septième ou de la dixième heure, on note l'envahissement du sang et des viscères par de nombreux germes sans affinité élective pour un viscère quelconque.

4) *Etude anatomique des lésions.* — Elles sont inégalement distribuées, plus précoces et plus intenses dans le foie.

Dans les deux premières heures le foie est le siège de phénomènes congestifs avec grosse turgescence des éléments réticulaires, petits amas inflammatoires histio-lymphocytaires près de certains espaces portes et aussi en plein parenchyme. A la troisième heure on décèle une atteinte légère des cellules dans la zone intermédiaire des lobules. Certains noyaux sont altérés, de dimensions inégales et d'affinités tinctoriales différentes. De la cinquième à la septième heure s'établissent des lésions considérables, dégénérescence granuleuse de tout le tissu noble avec disparition progressive des limites cellulaires, noyaux en pycnose. Aux dernières

heures, sur certaines coupes, le tissu hépatique est à peine reconnaissable.

La rate présente dès la première heure une congestion importante avec début d'hyperplasie cellulaire. A la deuxième heure il existe une énorme multiplication et mobilisation cellulaire avec tendance à l'homogénéisation comme si tout le tissu splénique se transformait en tissu glomérulaire. A la cinquième heure apparaissent en outre des lésions dégénératives de la trame réticulaire. Dans les heures qui suivent, l'hyperplasie des cellules spléniques est considérable, de nombreux noyaux des cellules de Malpighi sont en pycnose; certaines coupes peu avant la mort montrent des foyers de nécrose hémorragique totale.

Les lésions du rein sont beaucoup plus discrètes que celles des organes précédents. Dans les deux premières heures, on note une congestion très importante surtout glomérulaire sans lésions épithéliales. A la cinquième heure la congestion est intense, l'épithélium est turgescent, tendant à oblitérer la lumière des tubes qui, dans l'ensemble, sont à peu près conservés. De la septième à la dixième heure les lésions épithéliales se précisent, on trouve quelques cellules en dégénérescence vacuolaire, mais les lésions restent discrètes dans l'ensemble. Au moment de la mort il existe parfois des traînées inflammatoires interstitielles; de place en place un début de desquamation épithéliale avec noyaux en pycnose.

Les lésions pulmonaires restent toujours effacées. A la troisième heure apparaît un processus important de congestion capillaire, mais sans réaction péri-bronchovasculaire, ni lésions alvéolaires. Ces lésions restent en général les seules qu'on observe jusqu'aux lésions d'alvéolite exsudative légère agoniques.

En résumé, septicémie foudroyante, plus rapidement mortelle que la septicémie de l'inoculation sous-cutanée dans la majorité des cas, avec lésions anatomiques dominantes dans le foie par leur intensité et leur précocité (à signaler le début constant des lésions ou leur prédominance, dans la zone moyenne fragile du lobule hépatique). L'intérêt primordial

de l'inoculation dans le péritoine est la pullulation des germes qui atteint son maximum de la troisième à la sixième heure. C'est d'après l'étude d'un grand nombre d'inoculations péritonéales que nous avons repris et précisé pour les auteurs français, l'épreuve du péritoine de la souris pour le diagnostic rapide des pneumococcies, application que nous développerons plus loin.

c) Souris inoculées par voie aérienne

Nous avons vu la méthode employée : instillation dans les narines de 2/10 de cc., la souris étant endormie à l'éther. Dans un premier temps, la méthode étant d'emploi relativement récent, nous avons voulu nous rendre compte



FIG. 4. — Cobaye. Inhalation sous narcose d'encre de chine. Sacrifice de l'animal à la 45^e minute. Etat des poumons infiltrés d'encre de chine à l'autopsie.

du mode de pénétration dans les poumons d'une substance instillée dans ces conditions. Après Neufeld, nous avons étudié l'instillation d'encre de Chine. Les résultats sont concluants, aussi bien chez la souris que chez le cobaye, quinze

minutes environ après la fin de l'inhalation on constate que l'encre de Chine diffuse à partir des hiles pulmonaires dans chacun des lobes. A la fin de la première heure l'encre de Chine a pénétré profondément le parenchyme pulmonaire mais irrégulièrement selon les lobes. La figure 4 montre sa pénétration et sa progression. Dans certains cas où nous avons instillé des doses plus importantes, les souris sont mortes en quelques heures, vraisemblablement asphyxiées, un ou plusieurs des lobes pulmonaires se trouvaient transformés en une masse uniformément noire et tendue, les autres étaient largement envahis.

Nous avons essayé l'instillation directe sans narcose d'encre de Chine. La pénétration de l'encre de Chine est possible aussi bien chez la souris que chez les cobayes mais au prix de nombreuses expirations volontaires et éternuements de défense qui obligent à employer des quantités plus importantes de substance. Ces réflexes de défense seraient dangereux si l'on employait une culture virulente.

Nous avons également étudié la pénétration de l'encre de Chine après anesthésie locale du nez avec une solution de novocaïne, soit par imbibition prolongée des muqueuses nasales et buccales (solution à 1 p. 10), soit dans le cas du cobaye par injections aux orifices nasaires (solution à 1 p. 100) associées à une imbibition profonde. Cette méthode rend plus facile l'instillation de l'encre de Chine mais n'abolit pas complètement les réactions de défense. En outre la novocaïne se montre très toxique pour ces petits animaux (mort fréquente par œdème suraigu des poumons).

Nous avons conservé le procédé de la narcose au cours de nos expériences qui ont été faites sur un nombre de cas très limité (trente-deux souris) par rapport à celui de nos inoculations sous-cutanées et péritonéales. Nous ne voulons pas donner des conclusions sur l'infection par voie aérienne mais seulement les constatations que nous avons faites.

Nous avons observé deux types d'évolution : la septicémie rapidement mortelle en vingt heures telle qu'on l'observe après inoculation sous-cutanée ou même péritonéale, la sou-

ris présentant en quelques heures des signes évidents de maladie ; la mort retardée en six à huit jours avec lésions locales typiques de broncho-pneumonie. Il est à remarquer que ces résultats ont été obtenus avec une même souche (pneumocoque type XVI) à quelques jours de distance dont la virulence lors de la première série d'expériences était telle qu'elle tuait la souris en 40 heures à la dose de 10^{-6} cc. Nous nous défendons d'interpréter ces modalités évolutives, pour rester objectifs nous croyons préférable la simple présentation des faits.

Chacun de ces types évolutifs a comporté :

- l'étude de la bactériémie horaire ;
- l'examen de frottis d'organes en série ;
- l'étude anatomique de l'évolution de l'infection.

1) *Septicémie foudroyante.* — Les hémocultures dès la première heure se sont montrées positives et sont restées positives jusqu'à la mort des animaux en 20 heures environ.

Les frottis d'organes montrent la présence de pneumocoques pendant toute la durée de l'évolution. Peu nombreux dans les premiers stades de l'infection, leur nombre croît progressivement et dans les dernières heures, certains frottis montrent une véritable pullulation sans affinité viscérale précise.

Macroscopiquement des lésions pulmonaires sont visibles dès la septième heure sous l'aspect de taches grisâtres contrastant avec la coloration rouge des poumons turgescents. Les lésions sont de plus en plus étendues au fur et à mesure que progresse l'infection et atteignent les différents lobes pulmonaires avec une prédominance variable selon les cas. Dans les dernières heures les poumons sont hépatisés dans leur ensemble et mis dans l'eau tombent au fond du bac.

Histologiquement on note dès la fin de la première heure dans les poumons un processus important de bronchite et d'alvéolite simultanées, avec congestion intense et tendance aux formations nodulaires. A la deuxième heure les lésions

se sont précisées, c'est un aspect de broncho-pneumonie à foyer disséminées avec participation bronchique importante (épithélium desquamé, dégénérescence épithéliale) en certains points les nodules d'inflammation péri-bronchique ont une tendance nécrotique. Ces lésions si marquées à une phase précoce vont encore s'étendre et s'intensifier jusqu'à la mort et seront en outre semées de foyers hémorragiques et nécrotiques importants. Dans le foie les lésions sont comparables à celles de l'inoculation intra-péritonéale : dès la cinquième heure il existe des lésions considérables, dégénérescence granuleuse massive du protoplasma et altérations nucléaires ; dans les heures qui suivent les lésions s'intensifient encore et aboutissent à la disparition des limites cellulaires. La rate d'abord congestionnée présente rapidement des lésions d'hyperplasie des éléments spléniques et réticulaires, tendance à l'homogénéisation puis à la nécrose. Les lésions rénales sont plus effacées, il existe une congestion intense généralisée dès les premières heures, la dégénérescence épithéliale est tardive et reste effacée, s'accompagne de traînées inflammatoires interstitielles et même de petits abcès dans le parenchyme.

En résumé, dans cette série d'expériences nous avons vu évoluer une infection qui par sa rapidité, l'étendue des lésions, ne peut être comparée qu'aux inoculations péritonéales. On y a observé en plus des lésions pulmonaires broncho-pneumoniques massives et précoces.

2) *Septicémie subaiguë avec localisations pulmonaires prédominantes.* — Les hémocultures se sont montrées positives pendant les deux premières heures de l'évolution, négatives de la troisième à la septième heure, puis positives jusqu'à la fin de l'évolution, à partir de la dixième heure.

On conçoit que de telles observations soient sujettes à variations importantes selon l'importance de l'absorption par les voies respiratoires et selon les défenses de chacun des animaux. Néanmoins le point intéressant à retenir, nous semble-t-il, est la possibilité d'une bactériémie initiale accom-

pagnant l'inondation du parenchyme pulmonaire par une culture microbienne, un intervalle pendant lequel les germes disparaissent de la circulation sanguine, enfin la réapparition d'hémocultures positives liée sans doute au développement du processus infectieux grave dans les poumons qui peut n'entraîner la mort qu'au bout de plusieurs jours (huitième jour pour la souris 861).

Dans les poumons les pneumocoques sont d'abord nombreux (8, 15, 50 par champ) jusqu'à la cinquième heure par exemple, puis ils se raréfient, mais un examen minutieux des frottis montre leur présence à peu près constante pendant toute la durée de l'évolution. Au moment de la mort leur nombre est plus important (3 à 8 par champ) sans qu'il puisse être par conséquent comparé aux chiffres du début. Dans les frottis de sang du cœur et d'organes on ne trouve pratiquement pas de pneumocoques jusqu'aux dernières heures. A cette phase leur nombre est encore très discret.

Des lésions macroscopiques sont visibles dès la troisième heure et leur développement tend à s'accroître. Les poumons sont rouge foncé et sur ce fond se détachent des zones plus sombres, irrégulières, inégales mais toutes de petite dimension, réalisant un semis de couleur grisâtre sur l'ensemble des poumons. Tous les lobes sont intéressés, mais les taches grises (qui semblent correspondre à un processus hémorragique ou congestif sous-jacent) sont particulièrement nettes sur les lobes inférieurs et gauches. Les poumons flottent à la surface de l'eau dans les premières heures; lorsque les souris sont mortes avec un processus pulmonaire important ils tombent au fond du bac.

L'étude histologique montre dans les poumons d'abord une congestion très active (Fig. 5) et dès la troisième heure l'apparition de lésions alvéolaires très discrètes qui s'intensifient dans les heures qui suivent sans hépatisation vraie (Fig. 6). A la dixième heure il existe une tendance des lésions alvéolaires à former des nodules inflammatoires cependant que la diapédèse des polynucléaires est très intense

le long des gros vaisseaux (Fig. 7). Au huitième jour dans le cas d'une souris (861) morte spontanément, nous avons trouvé des lésions massives d'alvéolite avec mobilisation

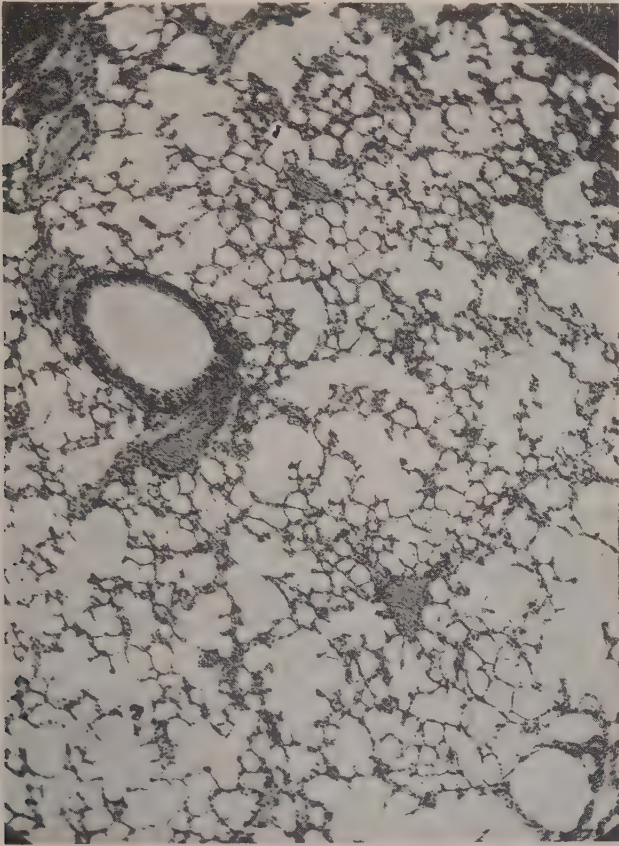


FIG. 5. — Inhalation sous narcose de 2/10 cc. d'une culture de pneumocoques virulents de 18 heures. Sacrifice de l'animal à la 2^e heure.
Congestion très active de la trame pulmonaire.

importante des éléments alvéolaires ; toutes les bronches étaient obstruées par des amas inflammatoires suppurés mais leur épithélium peu atteint ou intact soulignait l'im-

pression donnée par les premiers examens, à savoir, que les lésions primitives sont des lésions d'alvéolite et que l'extension aux bronches est secondaire. Dans le cas d'une sou-

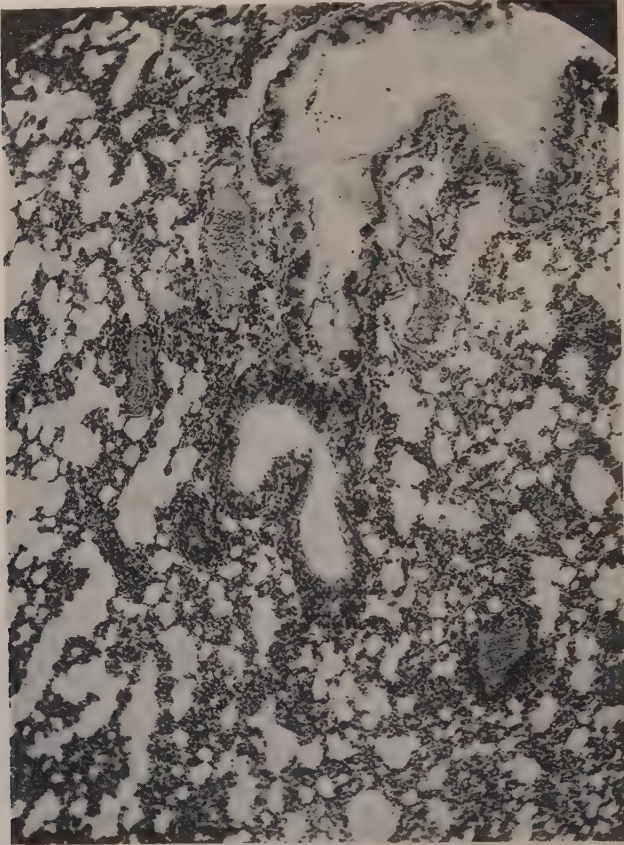


FIG. 6. — Inhalation sous narcose de 2/10 cc. d'une culture de pneumocoques virulents de 18 heures. Sacrifice de l'animal à la 5^e heure.

Congestion intense de la trame pulmonaire et début de lésions alvéolaires.

ris (862) *sacrifiée* au dixième jour de l'inoculation, nous avons trouvé des lésions typiques de broncho-pneumonie à

foyers disséminés avec une atteinte minime de l'épithélium bronchique confirmant l'examen précédent (Fig. 8).

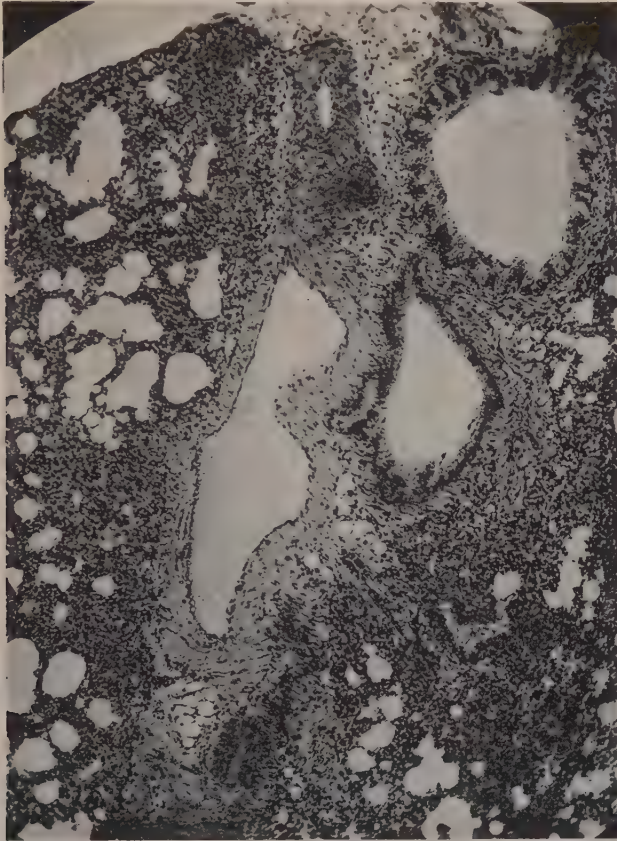


FIG. 7. — Inhalation sous narcose de 2/10 cc. d'une culture de pneumocoques virulents de 18 heures. Sacrifice de l'animal à la 10^e heure.

Lésions alvéolaires intenses tendant à la formation de nodules inflammatoires péri-bronchiques.

Le foie montre dans les premières heures une congestion intense avec importante hyperplasie des éléments du système réticulo-endothélial. Les lésions épithéliales restent

modérées pendant les quinze premières heures. Au bout de plusieurs jours on observe les aspects habituels d'un foie infectieux, dégénérescence graisseuse des cellules et lésions

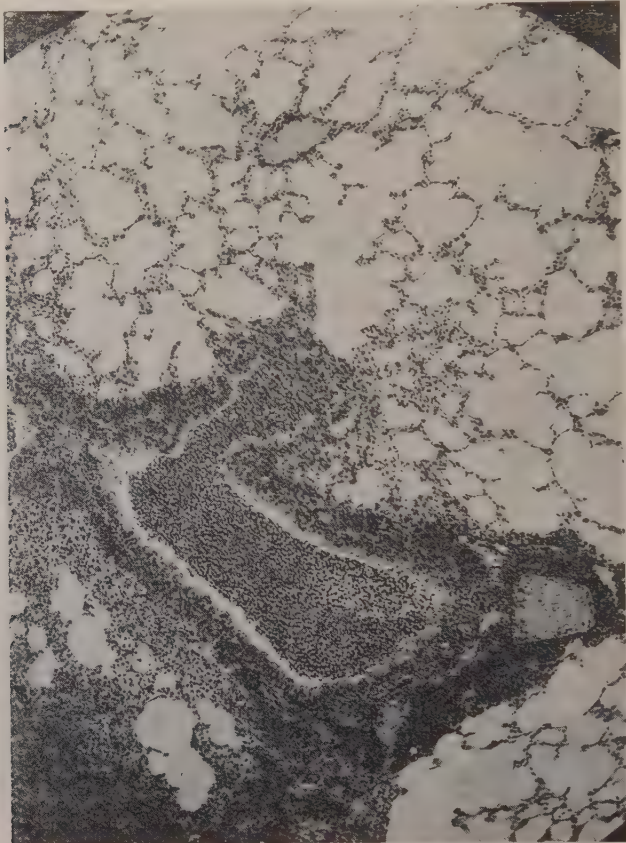


FIG. 8. — Inhalation sous narcose de 2/10 cc. d'une culture de pneumocoques virulents de 12 heures. Sacrifice de l'animal au 8^e jour.

Lésions typiques de broncho-pneumonie. Atteinte modérée de l'épithélium bronchique.

dégénératives nucléaires avec, selon les cas, présence ou non d'amas inflammatoires à tendance nécrotique en plein parenchyme ou au voisinage des espaces portes.

Les reins montrent des lésions de congestion plus ou moins marquées, puis l'apparition de traînées inflammatoires interstitielles. A partir de la quinzième heure apparaissent des lésions de néphrite épithéliale, d'abord très modérées elles sont assez marquées au bout de plusieurs jours. On peut voir alors des petits amas inflammatoires en plein parenchyme.

La rate d'abord congestionnée offre à partir de la dixième heure l'image d'une mobilisation cellulaire importante avec réaction réticulaire. Dans les jours qui suivent jusqu'à la mort (huitième jour) ou sacrifice de l'animal (dixième jour) elle offre l'aspect d'une rate infectieuse avec hyperplasie des éléments spléniques sans grosses lésions dégénératives.

2° LA PNEUMOCOCCIE PROLONGÉE DE LA SOURIS

Cette évolution a été trouvée à la suite d'inoculations sous-cutanées et intra-péritonéales. Nous ne l'avons pas encore cherchée après les inoculations par voie respiratoire.

Dans la deuxième partie de nos recherches, sur 460 inoculations de produits pneumococciques (en général nous utilisons des produits virulents) nous avons observé 25 cas de survie anormale de la souris. Selon les conceptions classiques nous avons rapporté la survie de ces souris à l'avirulence des substances inoculées. Nous y étions d'autant plus enclin qu'au cours des sacrifices successifs de souris inoculées avec les mêmes produits nous observions des signes manifestes de défense péritonéale : phagocytoses, diminution progressive des germes dans la cavité péritonéale aboutissant à un véritable nettoyage de la séreuse. Notre but était alors d'étudier surtout des produits virulents et ces évolutions prolongées observées au hasard de nos recherches ne retinrent pas tout d'abord notre attention. Peu à peu des examens autopsiques complets de nos animaux longtemps après leur inoculation, nous ont fait soupçonner l'existence d'une infection pneumococcique chronique de la souris ne déterminant aucune maladie décelable.

Ces 25 observations de survie anormale rapportée à l'avirulence peuvent se diviser en deux groupes:

1° Un groupe de 14 souris chez lesquelles nous n'avons pu mettre en évidence les preuves d'une infection pneumococcique prolongée, les souris 20, 21, 32, 41, 44, 57, 63, 222, 226, 231, 232, 233, 284, 306, mortes respectivement 21, 29, 23, 12, 29, 8, 7, 26, 90, 32, 11, 12, 50, 66 jours après l'inoculation intra-péritonéale ou sous-cutanée de produits sûrement pneumococciques. Seules les souris 226, 231, 232, 306 ont été sacrifiées aux dates énoncées ci-dessus et particulièrement examinées au point de vue d'une infection pneumococcique latente; les autres sont mortes spontanément, soit en bon état apparent, soit pour certaines d'entre elles avec des signes manifestes de maladie. Nous avons recherché le pneumocoque chez ces quatorze souris, sur les frottis du sang du cœur, et des divers viscères (foie, rate, reins, poumons, cerveau) par les cultures du cerveau et de la sérosité péritonéale. Ces moyens d'investigation n'ont pas été mis systématiquement en œuvre chez chacune des souris, peu prévenus que nous étions alors, de la possibilité d'infections pneumococciques latentes ou très prolongées. Nous croyons aujourd'hui que c'était peut-être le cas d'un certain nombre d'entre elles.

2° Un groupe de 11 souris chez lesquelles, alerté par les cas précédents observés fortuitement, nous avons pu faire la preuve de l'existence d'une infection pneumococcique latente prolongée de la souris. Chacune d'elle mérite un certain développement:

— La souris 31, inoculée dans la cavité péritonéale avec 2/10 de cc. de pus d'une pleurésie purulente à pneumocoque, atténué par un séjour de 24 heures à la température du laboratoire, meurt sans signes de maladie manifestes, 17 jours après l'inoculation. Dans la sérosité péritonéale on met en évidence d'assez nombreux pneumocoques à l'examen direct. On n'en trouve pas dans les divers viscères. Les cultures n'ont pas été pratiquées.

— La souris 159 est inoculée sous la peau avec 2/10 de cc. de pus d'une vomique à pneumocoques, recueillie par tubage gastrique chez un enfant. La souris est sacrifiée en bonne santé apparente 26 jours après l'inoculation. On ne peut mettre en évidence aucun germe dans le sang ni dans les frottis des divers viscères. Les cultures du cerveau et du sang en bouillon T restent négatives. Mais on obtient une preuve biologique de l'in-

fection pneumococcique latente : l'inoculation intra-péritonéale de 2/10 de cc. des viscères à la souris 200 détermine sa mort en quatre jours et demi environ et il existe des pneumocoques typiques sur les frottis de cerveau, reins, rate, foie, poumons, sang ; l'inoculation sous-cutanée de 2/10 de cc. des viscères de 159 à la souris 201 détermine sa mort en six jours et demi et l'on trouve des pneumocoques dans les frottis des divers organes ; l'inoculation intra-péritonéale de 2/10 de cc. de cerveau à la souris 202 entraîne sa mort en 42 heures et l'on trouve des pneumocoques dans les frottis des divers viscères, le sang ensemené en bouillon T donne en 20 heures une culture riche et pure de pneumocoques.

— La souris 220 est inoculée dans la cavité péritonéale avec 2/10 de cc. de crachats d'une malade atteinte de congestion pulmonaire atténuée, elle meurt au neuvième jour avec des signes manifestes de maladie ; on trouve des pneumocoques dans les viscères, l'ensemencement du cerveau donne en 24 heures une culture riche et pure de pneumocoques.

— La souris 223, inoculée sous la peau avec 2/10 de cc. du cerveau de la souris 220, meurt au septième jour avec des signes antérieurs de maladie et les frottis des divers organes montrent des pneumocoques typiques.

— La souris 236, inoculée sous la peau avec 2/10 de cc. d'un broyage des viscères d'un lapin mort de pneumococcie en quatre jours, est sacrifiée 30 jours après l'inoculation. Sur les frottis d'organes on trouve de rares pneumocoques. Les cultures du cerveau et de la sérosité péritonéale restent négatives. L'inoculation intra-péritonéale de 2/10 de cc. de cerveau de la souris 236 à la souris 293 détermine la mort de cette dernière en 36 heures environ avec de nombreux pneumocoques dans tous les viscères. L'ensemencement du cerveau en bouillon T pousse richement en 20 heures en pneumocoques caractéristiques. L'inoculation intra-péritonéale de 2/10 de cc. du broyage des viscères de la souris 236 à la souris 294 détermine la mort de cette dernière en 46 heures ; l'ensemencement du cerveau donne une riche et pure culture de pneumocoques.

— La souris 285, inoculée sous la peau avec 2/10 de cc. de crachats riches en pneumocoques d'un malade atteint de tuberculose pulmonaire présentant un épisode aigu, meurt 13 jours

après l'inoculation. On trouve des pneumocoques dans les divers viscères, la culture du cerveau en bouillon T reste négative. La souris 295, inoculée avec 2/10 de cc. du cerveau de 285, meurt au vingtième jour sans maladie apparente, on trouve des pneumocoques dans les divers viscères et l'ensemencement du cerveau donne en 24 heures une culture riche de pneumocoques.

— La souris 292, inoculée dans le cerveau avec 2/10 de cc. d'une culture de pneumocoques de 24 heures provenant d'une septicémie humaine, meurt 55 jours après l'inoculation. On trouve de nombreux pneumocoques typiques dans les frottis des viscères, l'ensemencement du cerveau donne une riche culture de pneumocoques. La souris 357, inoculée dans le péritoine avec 2/10 de cc. de cette culture, meurt en 15 heures et l'on trouve une pullulation de pneumocoques dans les viscères. La souris 358, inoculée sous la peau avec 2/10 de cc. de la même culture, est sacrifiée au bout de 27 heures et l'ensemencement de la cavité péritonéale donne une culture pure de pneumocoques.

— La souris 295, morte au vingtième jour de l'inoculation, a été étudiée ci-dessus (cf. souris 285).

— La souris 302, inoculée avec 2/10 de cc. de crachats d'une malade atteinte de pneumopathie traînante meurt, malade, quatorze jours après l'inoculation; on trouve des pneumocoques dans la cavité péritonéale et les organes; l'ensemencement du cerveau donne en 24 heures une culture riche et pure de pneumocoques. L'inoculation intra-péritonéale de 2/10 de cc. de cerveau à la souris 329 détermine la mort en moins de 24 heures; on trouve de nombreux pneumocoques dans le sang du cœur et dans les divers viscères. L'inoculation sous-cutanée de 2/10 de cc. de cerveau à la souris 330 détermine la mort en 48 heures; les frottis de la sérosité péritonéale, des reins, de la rate, du foie montrent des pneumocoques. Les cultures de la sérosité péritonéale et du cerveau restent négatives.

— La souris 331, inoculée avec 2/10 de cc. de cerveau de 284 (morte au cinquantième jour sans qu'on puisse faire la preuve d'une infection pneumococcique prolongée), est sacrifiée en bon état 90 jours après l'inoculation. L'examen des frottis viscéraux ne montre pas de germes typiques; la culture de la sérosité péritonéale reste négative mais l'ensemencement du cerveau donne en 24 heures une riche culture de pneumocoques. L'inoculation

intra-péritonéale de 2/10 de cc. de cette culture à la souris 432, que l'on sacrifie à la deuxième heure, montre la présence de pneumocoques dans les frottis de poumon et dans la sérosité péritonéale.

— La souris 333, inoculée dans la cavité péritonéale avec 2/10 de cc. de crachats contenant des pneumocoques d'une malade atteinte de tuberculose au cours d'un épisode aigu, est sacrifiée au cinquantième jour en bon état. On ne trouve pas de pneumocoques dans les frottis des divers viscères, les cultures du cerveau et de la sérosité péritonéale restent négatives, mais l'inoculation intra-péritonéale de 2/10 de cc. de cerveau à la souris 394 se montre mortelle en 21 heures ; on met en évidence des pneumocoques dans les divers viscères.

En résumé ces observations démontraient manifestement par leur nombre, l'existence d'une infection pneumococcique latente de la souris susceptible de durer jusqu'à 90 jours. Des critères tels qu'un ensemencement du cerveau donnant une culture pure de pneumocoques ou une reprise de virulence par passages d'organes à d'autres souris qui mouraient rapidement de septicémie pneumococcique ne laissaient plus de place au doute. Le cerveau dont l'envahissement par d'autres germes lors de l'agonie ou après la mort avait particulièrement retenu notre attention pour l'identification de l'infection prolongée, soit au moyen de cultures, soit par passages à d'autres souris. Dans certains cas nous avons même pu mettre en évidence des lésions histologiques cérébrales : la souris 220 avait plusieurs foyers d'encéphalite avec lésions vasculaires importantes (lumière comblée par une substance homogène, présence de manchons lymphocytaires); la souris 331 avait des lésions de périvascularite manifestes avec amas lymphocytaires.

Un certain nombre d'objections pouvaient être opposées à ces constatations : le produit pathologique injecté n'était pas pur dans la plupart des cas, les souris mortes spontanément et pas toujours autopsiées sur-le-champ pouvaient présenter une infection agonique ou être envahies par des germes de putréfaction diplococciformes.

Nous avons donc repris une série d'expériences en partant d'une souche pure que nous savions avirulente, fournie par l'Institut Pasteur (Laboratoire de M. Legroux, Pneumocoque II). Nous avons employé les critères d'identification que nous avons vus plus haut sans nous dissimuler leur imperfection dans le cas de souche avirulente, la contingence de certains caractères cultureux, la lyse biliaire absente, la séro-agglutination douteuse.

Nous avons d'abord étudié la souche employée, conservée depuis quatre mois en gélatine à la glacière. Elle avait les caractères suivants : cultures poussant abondamment en 24 heures sur nos milieux usuels; lyse des sels biliaires négative à la quatrième heure; agglutination importante des germes par le sérum II, légère par le sérum III, nulle par le sérum I (sérums de cheval de l'Institut Pasteur); avirulence pour la souris.

Nos expériences se sont étendues sur près de huit mois ; nous avons gardé les animaux au laboratoire dans les meilleures conditions de soins et de surveillance. Nous avons inoculé 2/10 de cc. d'une culture d'âge variable de la souche précédente, à 16 souris dans la cavité péritonéale et à 16 souris sous la peau, à la base de la queue.

Nous avons obtenu deux cas de pneumococcie prolongée (souris 463 et 475) à la suite des inoculations précédentes, et trois cas par passages des souris ainsi infectées (souris 483, 495, 493). Nous n'avons pas tenu compte d'un cas de pneumococcie prolongée vraisemblable obtenu à partir de la culture, à cause d'une surinfection résultant des manipulations autopsiques.

Notre premier exemple est la souris 463 qui, inoculée sous la peau, est sacrifiée en parfait état le trentième jour de l'inoculation. La recherche de pneumocoques sur les frottis d'organes et du sang est négative. *Mais la culture du cerveau pousse en 24 heures* abondamment et montre de nombreux pneumocoques typiques en chaînettes courtes, et en diplocoques. Lyse biliaire négative. Agglutination exclusive au sérum II. La culture fragile meurt au bout de trois repiquages en moins de cinq jours. Le

cerveau est inoculé à la souris 482 (péritoine) sans résultat, les viscères aux souris 484 (péritoine) et 485 (peau) sans résultats ; *mais l'inoculation sous-cutanée du cerveau à la souris 483 est positive*, après sacrifice au quarante-neuvième jour on constate la présence de pneumocoques dans le cerveau par culture. Cette nouvelle culture est de conservation facile par rapport à la précédente, les pneumocoques ne sont pas lysés par la bile, l'agglutination est positive avec le sérum II, négative avec les sérums I et III. Les cultures de la sérosité péritonéale et du sang restent négatives. Les recherches n'ont pas été poussées plus avant cette souris ne servant qu'à la vérification de 463. La culture du cerveau de la souris 463 est inoculée dans les conditions habituelles (2/10 cc.) à la souris 495 qui est sacrifiée 56 jours après l'inoculation. Les cultures du cerveau et de la sérosité péritonéale restent négatives *mais la culture du sang du cœur est positive*. C'est une culture de pneumocoques caractéristiques. Les recherches ne sont pas poussées plus avant, cette souris 495 ne servant qu'à la vérification de 463.

Ainsi, à partir de la souche avirulente initiale, nous obtenons une pneumococcie prolongée latente de 30 jours (463), une autre de 49 jours (483) par passage du cerveau de 463, une autre de 56 jours (495) par passage de la culture de cerveau de 463.

Notre deuxième exemple de pneumococcie prolongée obtenu directement à partir de la souche de l'Institut Pasteur n'est pas moins démonstratif. La souris 475 est inoculée sous la peau avec 2/10 de cc. d'une culture de 11 jours conservée à l'étuve. Elle est sacrifiée en parfait état apparent 68 jours après l'inoculation. L'examen des frottis des organes et du sang ne révèle pas de pneumocoques. Les cultures du sang et de la sérosité péritonéale sont négatives. *L'ensemencement* du cerveau donne en 24 heures une riche culture de pneumocoques qui semblent un peu altérés, avec chaînettes à éléments inégaux, prenant mal les colorants. Les cultures en bouillon T et en gélose T sont d'allure pneumococcique. Le germe fait fermenter l'inuline tournesolée et fait rougir le milieu. La lyse par les sels biliaires est négative. L'agglutination est négative avec les sérums I, II, III. Fait remarquable, le germe est de conservation très facile. Nous avons demandé confirmation diagnostique à M. Cotoni, qui a conclu à un *pneumocoque en voie de dégradation*, à cultures abondantes, à morphologie microscopique de pneumocoques, à lyse biliaire douteuse, inagglutinabilité, tous caractères appartenant à une souche « avirulente ». Nous nous sommes efforcé de remonter

la virulence par passages sur l'animal ; 52 souris, 26 lapins ont été inoculés les uns avec des cultures jeunes, les autres par passages de viscères (de cerveau surtout) ; nous avons essayé les injections intra-testiculaires chez le lapin et le passage du broyage de testicules à d'autres lapins. Toutes ces inoculations, lorsque l'animal était sacrifié suffisamment tôt, permettaient de retrouver la souche 475 avec les mêmes caractères. Dans six cas, elle semble avoir repris une haute virulence (lapins 4, 8, 10, 13, âgés de moins de 3 mois lors de l'inoculation, souris 682 et 686). Le lapin 4 est inoculé avec le culot de centrifugation d'une culture de 24 heures repris dans 2 cc. de sérum physiologique. On inocule dans le cerveau du lapin 3/10 de cc. de l'émulsion précédente. Le lapin est sacrifié 8 jours après l'inoculation, la culture du cerveau est négative. Le lapin 7 est inoculé dans le cerveau avec 6/10 de cc. du broyage en mortier stérile du cerveau du lapin 4. *Il meurt en 13 heures* environ, les frottis du cerveau montrent des pneumocoques assez nombreux sous forme de diplocoques et de courtes chaînettes, la culture du cerveau pousse pure en pneumocoques en 48 heures. Le lapin 8 inoculé dans le cerveau avec 4/10 de cc. d'un broyage de cerveau du lapin 7 meurt en moins de 14 heures, les frottis de cerveau montrent la présence de pneumocoques. Le lapin 10 est inoculé dans le cerveau avec 3/10 de cc. d'une culture de 6 heures repiquée à partir de la souche cerveau du lapin 7 ; il meurt en moins de 14 heures ; les frottis du cerveau montrent des diplocoques encapsulés typiques ; les cultures du cerveau et du sang poussent en 48 heures en pneumocoques typiques ; l'examen histologique de l'encéphale montre des placards de méningo-vascularité corticale à prédominance de polynucléaires et présence de pneumocoques sur les coupes dans les amas inflammatoires.

Le lapin 13 est inoculé dans le cerveau avec 2/10 de cc. de la souche 475, repiquage de 20 heures ; à ce moment, on l'étudie à nouveau, la lyse biliaire est toujours négative, l'agglutinabilité immédiate est négative aux sérums de cheval de l'Institut Pasteur I, II, III, mais au bout de 18 heures, il existe une agglutination légère avec les sérums I et II, alors qu'elle est nulle avec le III et que le tube témoin n'est pas modifié. Le lapin est sacrifié à la quarante-huitième heure. La culture du cerveau pousse pure en pneumocoques typiques ; l'agglutination extemporanée macroscopique est nulle avec les sérums I et III, très importante avec le sérum II (15^e minute) comme si le passage par le lapin avait activé et « spécifié » l'aptitude du germe à l'agglutination. Une des souris (682) inoculée dans le péritoine avec 2/10 de cc.

du cerveau du lapin 13 est très malade 4 jours après l'inoculation et sacrifiée. La culture du cerveau est souillée mais on note dans l'urine la présence de pneumocoques. On inocule la souris 686 avec 2/10 de cc. du cerveau de 682 et elle meurt au septième jour de l'inoculation ; l'ensemencement du cerveau donne une culture de pneumocoques.

Nous verrons ultérieurement que la souche 475 a permis d'immuniser un lot de souris contre une souche de pneumocoques de virulence élevée. C'est un argument de plus de la nature pneumococcique du germe 475 (voir p. 100).

En résumé, notre souris 475 a présenté une infection latente pendant 68 jours. La souche isolée à partir du cerveau à ce moment a pu être caractérisée comme une souche dégradée avirulente bien que dans quelques cas elle se soit montrée très pathogène pour le lapin et accessoirement pour la souris après passages par le lapin.

Un dernier exemple indirect de pneumococcie prolongée nous a été fourni par la souris 493, inoculée sous la peau avec 2/10 de cc. des viscères de 465 (inoculée sous la peau avec 2/10 de cc. de la culture initiale et sacrifiée 32 jours après l'inoculation sans qu'on puisse faire la preuve d'une pneumococcie). Cette souris 493 est sacrifiée 57 jours après l'inoculation ; l'examen des frottis et du sang ne montre pas de pneumocoques ; les cultures du cerveau et de la sérosité péritonéale sont négatives mais l'ensemencement du sang du cœur donne en 24 heures une riche culture de pneumocoque que l'on caractérise. Cette souris ne servant qu'à la vérification de 465, on ne pousse pas plus avant les inoculations à l'animal.

Cette deuxième série d'expériences, faite dans les conditions les plus rigoureuses, nous semble apporter la preuve de la pneumococcie prolongée de la souris.

Cette notion doit faire distinguer deux groupes parmi les pneumocoques « avirulents » en apparence : les uns sont réellement avirulents, la souris inoculée s'en débarrasse rapidement par pexie, lyse ou élimination sans manifester aucun signe pathologique et sans qu'il soit possible, ultérieurement, de retrouver ces germes en aucun point de l'économie ; les autres, au contraire, sont capables ou de donner à la souris une maladie lente, ou d'être hébergés par elle en

un parasitisme apparemment bien supporté, peut-être électivement dans les centres nerveux.

3° LA GUÉRISON

Nos expériences n'ont pas particulièrement porté sur le processus de guérison dans les diverses formes d'infection. Nous ne signalerons que les faits observés avec certitude dans l'évolution des souris inoculées.

L'inoculation sous-cutanée d'un produit pneumococcique pathologique ou d'une culture est fréquemment suivie de guérison. Dans ce cas, lors de sacrifices d'heure en heure de souris inoculées on ne décèle dans les frottis aucun pneumocoque ou seulement exceptionnellement et dans les deux ou trois premières heures. Avant d'affirmer la guérison dans les cas nécessitant un résultat rigoureux, on devra ensemen- cer le sang du cœur, le cerveau et pratiquer des inoculations de cerveau et de viscères à d'autres souris pour éliminer la possibilité de pneumococcie prolongée.

L'inoculation intra-péritonéale est également souvent suivie de guérison. Si l'on suit d'heure en heure l'évolution des germes injectés dans la cavité péritonéale on observe des phagocytoses, leur disparition progressive au lieu de la pul- lulation que l'on pouvait attendre. Dans les viscères on peut déceler quelques germes au début, mais ils disparaissent ra- pidement. Il ne faudra affirmer la guérison qu'avec certaines garanties : une survie suffisamment longue de l'animal, ab- sence de pneumocoques à l'autopsie dans la sérosité périto- néale, dans le sang, dans les viscères ; cultures du sang et du cerveau négatives ; réinoculation du cerveau et des autres viscères négatives. Il va sans dire que ces précisions ont peu d'intérêt pratique et ne s'adressent qu'aux recherches rigou- reuses.

Nos expériences sur les inoculations respiratoires sont trop peu nombreuses pour nous permettre des remarques sur la guérison dans les infections aériennes. Signalons ce- pendant que dans une série d'expériences, l'inoculation de

huit souris avec un pneumocoque peu virulent n'a été suivi d'aucune maladie expérimentale apparente.

Nous n'avons étudié ni l'immunité active ni l'immunité passive. Nous retiendrons seulement quelques constatations sur l'immunité obtenue par inoculation d'une souche avirulente.

Les souris 770, 771, 772, 773, 774, 775 reçoivent chaque jour dans la cavité péritonéale, pendant 9 jours, 2/10 de cc. d'une culture 475 de 24 heures (souche étudiée à propos des pneumococcies prolongées). Le lendemain du dernier jour de la vaccination elles sont inoculées (les quatre premières dans le péritoine 770, 771, 772, 773, les autres 774, 775 sous la peau) avec 2/10 de cc. d'une souche Léonie très virulente. Aucune ne meurt. Quatre souris inoculées dans les mêmes conditions dans le péritoine ou sous la peau (souris 786, 789, 790, 795) meurent de la dix-septième à la quarante-huitième heure avec les signes d'une septicémie pneumococcique.

Nous avons donc dans cette petite série de cas, contrairement à l'opinion classique, obtenu une immunisation manifeste à partir de notre souche dégradée 475.

★ ★

Il nous reste à établir, d'après nos résultats, une évolution comparée des souris inoculées par les différentes voies. Nous éliminerons les inoculations nasales trop peu nombreuses et nous nous bornerons à un parallèle entre les souris inoculées dans le péritoine et les souris inoculées sous la peau.

En comparant l'évolution spontanée de 57 souris inoculées dans le péritoine et de 57 souris inoculées sous la peau avec le même produit pneumococcique, nous constatons que 39 fois (3/4 des cas environs), la souris inoculée dans le péritoine meurt avant la souris inoculée sous la peau ; 11 fois la souris inoculée sous la peau meurt la première ; cinq fois la mort survient sensiblement au même moment pour les deux souris, deux fois il nous a été impossible de préciser.

Lorsqu'il y a décalage entre les deux morts, le temps qui

les sépare est d'ailleurs très variable. Quand la précision est en faveur de l'inoculation péritonéale nous notons un intervalle qui va de trois heures à trente jours. Quand la précision est en faveur de l'inoculation sous-cutanée, l'intervalle s'étend de vingt-quatre heures à trois mois.

Est-il possible d'établir une relation entre l'heure de la mort, la voie d'inoculation et le germe en cause ?

A relire nos protocoles d'expérience il semble que les souris inoculées sous la peau meurent les premières quand, selon toute apparence, la virulence du germe se trouvait atténuée.

Nous relevons en effet dans l'inoculation sous-cutanée de nos souris : une souche II conservée au laboratoire depuis plusieurs mois, des crachats de congestion pulmonaire recueillis le huitième jour, des crachats recueillis à la fin d'une congestion pulmonaire post-anesthésique, des crachats pneumoniques prélevés cinq jours après la convalescence, deux passages du cerveau de souris de cette même souche, des pneumocoques associés dans des crachats de pleuro-pneumopathie staphylococcique, deux crachats où des pneumocoques s'associent à des bacilles de Koch chez deux malades atteints de pneumopathie bacillaire aiguë ; un crachat polymicrobien recueilli lors de la défervescence chez un malade atteint de pneumopathie aiguë du sommet droit.

Dans ces cas où, *a priori*, la virulence du pneumocoque se trouve atténuée, la souris se défend-elle moins bien quand on l'inocule sous la peau que dans le péritoine ? Tout paraît se passer comme s'il en était réellement ainsi.

CHAPITRE V

**MÉTHODES
DE DIAGNOSTIC RAPIDE
DES PNEUMOCOCCIES**

I. — Méthodes préconisées

L'emploi de la sérothérapie antipneumococcique souleva de nombreuses discussions tant que ne furent pas déterminés de façon précise les types de pneumocoques, tant qu'un sérum spécifique ne put être utilisé dans tous les cas. Les résultats étaient inconstants et contradictoires. Les progrès récents sont dus non seulement à la classification en types distincts et à la préparation de sérums correspondants, mais encore aux méthodes d'identification rapide qui ont été mises au point.

Nous ne ferons que rappeler la méthode de précipitation de l'antigène pneumococcique du malade par un sérum précipitant, proposée par Wadsworth et Avery. Le principe est d'obtenir l'antigène du malade sous une forme précipitable. Dans le procédé d'Avery (1918), on éclaircit par la bile une culture obtenue à partir des crachats et on cherche les réactions de précipitation à l'aide des divers types de sérum. Une variante est constituée par le procédé de Blake qui précipite l'exsudat péritonéal de la souris dilué et éclairci par centrifugation. Dochez et Avery ont proposé en outre la précipitation par un sérum spécifique d'une substance spécifique soluble qui passerait dans les urines des pneumoniques à partir de la douzième heure et persisterait pendant plusieurs jours après la fin de la maladie. Ces procédés ne sont plus employés pour la pratique du diagnostic rapide.

On s'adresse actuellement à deux méthodes pour arriver à ce diagnostic : l'une est l'agglutination par le sérum spécifique, l'autre le gonflement de la capsule de Neufeld.

La méthode de l'agglutination est employée depuis longtemps. On opéra d'abord sur des cultures pures obtenues à partir de produits pathologiques. Puis on remplaça la culture avec avantage pour la rapidité par l'inoculation du produit pathologique dans le péritoine de la souris ; l'exsudat péritonéal riche en germes et dilué permettant l'agglutination (Neufeld et Händel, 1912; Avery; Chickering, Cole et Do-

chez). Nous rappellerons la mise au point la plus récente faite par R. Armstrong, Logan et Smeall, Sabin.

Un cc. de produit pathologique est injecté dans le péritoine d'une souris ; après trois heures l'exsudat péritonéal est prélevé à travers la paroi à l'aide d'une pipette capillaire. S'il y a peu ou pas de germes, les ponctions sont répétées toutes les heures jusqu'à ce qu'on obtienne une quantité suffisante de microbes. Une goutte d'exsudat péritonéal diluée dans du sérum physiologique est mélangée à une goutte de sérum diagnostic. On colore légèrement à la fuchsine diluée. Dans le cas de sérum homologue, on obtient immédiatement une agglutination microscopique manifeste. Pour Sabin, l'épreuve est extrêmement fidèle et permet de donner un résultat en trois à cinq heures. Dans les cas exceptionnels où il y a un doute ou si l'on trouve deux types différents de pneumocoques, le test d'exclusion de Griffith est employé : on injecte simultanément dans le péritoine de la souris un cc. de crachat dilué et un demi-centimètre cube de sérum correspondant au type du pneumocoque trouvé ; on observe la maladie de la souris qui meurt d'une pneumococcie dans le cas d'un second type associé (on peut le déceler par ponction de la cavité péritonéale) et qui survit dans le cas contraire.

La méthode du gonflement de la capsule des pneumocoques d'un crachat s'adresse au phénomène signalé par Neufeld dès 1902, que nous avons étudié dans un chapitre précédent. Ettinger Tulczynska au laboratoire de Neufeld appliqua cette propriété au diagnostic des types de pneumocoques dès 1931. Armstrong en 1932 vulgarisa la méthode du gonflement des capsules dans l'expectoration pneumococcique pour le diagnostic rapide du type de pneumocoque. Logan et Smeall confirment ses résultats. F. Neufeld et E. Tulczynska en 1933 aboutissent à des conclusions également favorables mais insistent sur la nécessité d'employer du sérum de lapin. G. Cooper et A. Walter en 1935 étudient à leur tour l'application de la réaction de Neufeld à l'identification des types de pneumocoques ; elles précisent la méthode de préparation

des sérums diagnostics de lapin, soulignent les inconvénients liés au sérum de cheval et recommandent l'emploi de doses très importantes de sérum pour le gonflement des capsules : 4 à 40 parties de sérum pour une partie de produit pneumococcique afin d'éviter les erreurs tenant à l'insuffisance d'anticorps.

Nous avons vu en détail la recherche du test de Neufeld. Une parcelle de crachat est déposée sur une lame et finement mélangée à une goutte de sérum diagnostic (dans la proportion de 1 à 4 pour G. Cooper) et à une goutte de bleu de méthylène ou de Loeffler. L'examen au microscope quelques minutes plus tard, à l'immersion, montre le gonflement caractéristique du pneumocoque lorsqu'il est en présence de sérum homologue, l'absence de toute modification en cas de sérum hétérologue. Les sérums de diagnostic sont avec avantage répartis en neuf groupes afin de gagner du temps dans la détermination du type :

I

A = 2, 4, 5, 7.

B = 3, 8, 9, 14.

C = 6, 12, 17, 19.

D = 10, 13, 20, 22.

E = 16, 18, 23, 28.

F = 11, 21, 24, 25.

G = 15, 26, 29, 30.

H = 27, 31, 32.

C'est avec l'emploi de ces groupes qu'il faut une quantité importante de sérum, 40 parties pour 1 partie de produit pneumococcique selon Cooper.

Lorsqu'une réaction est trouvée dans un groupe, les différents types de ce groupe sont étudiés pour déceler le type responsable du gonflement (4 parties de sérum pour 1 partie de substance pneumococcique).

L'épreuve du gonflement des capsules peut être faite également sur l'exsudat péritonéal d'une souris inoculée ou sur une culture lorsque le nombre des germes est minime et ne permet pas la lecture d'une agglutination. La présence de

plus d'un type et leur importance relative peuvent même être déterminées par l'examen direct du crachat. Dans les cas difficiles on s'adresse au test d'exclusion de Griffith.

Chacune des deux méthodes, agglutination microscopique selon Sabin ou test de Neufeld, présente ses avantages. L'épreuve du gonflement de la capsule a l'avantage considérable de la simplicité et de la rapidité, il permet le diagnostic sur un nombre minime de germes qu'il s'agisse de crachat ou d'exsudat péritonéal, il est encore possible sur des crachats recueillis depuis un certain temps et même conservés à la glacière depuis plusieurs jours. Il est possible sur un produit pneumococcique de faible virulence ne déterminant pas de pullulation péritonéale ou de septicémie chez la souris, il élimine la cause d'erreur d'un animal porteur de germes. La méthode de l'agglutination sur les germes de pullulation péritonéale a divers avantages : elle donne des résultats définitifs dès un premier examen avec une plus grande fréquence (à condition qu'il s'agisse d'un produit virulent), l'exsudat pneumococcique à étudier est abondant, le péritoine a la propriété d'épurer le produit pathologique injecté, de permettre la pullulation des pneumocoques alors que les autres germes inoculés disparaissent.

Dans la pratique, les deux méthodes ne s'excluent pas, mais au contraire se complètent. Le faible pourcentage des cas où le test de Neufeld échoue pour des raisons variées sur lesquelles nous aurons à revenir est encore abaissé par l'identification du type selon Sabin si on a pris le soin d'inoculer parallèlement une souris dans le péritoine.

Il nous suffit de donner quelques chiffres pour montrer la valeur de ces méthodes dans le diagnostic rapide des pneumocoques auquel s'attachent tant les auteurs allemands et anglo-américains. Le pneumocoque obtenu à partir des crachats des malades atteints de pneumopathies aiguës est le type responsable de la maladie dans plus de 93 % des cas pour Bullowa. Ce chiffre est la conclusion de l'étude de 548 pneumonies où la confirmation du type a été demandée à la ponction directe du bloc hépatisé, à l'hémoculture, à l'exa-

men de foyers métastatiques. Le test de Neufeld donna dans 76 % des cas le type du pneumocoque à partir du premier crachat. D'autres auteurs donnent des chiffres favorables encore : William Parks et Vinograd, sur 106 cas, arrivent à un pourcentage de 90,5 % de résultats définitifs d'emblée par le test de Neufeld. Sappington, dans 51 cas de pneumonies, arrive au diagnostic du type, par le test de Neufeld, dans 44 cas à partir du premier crachat. Beckler et Mac Leod, examinant 760 expectorations de pneumoniques avec les 32 sérums de diagnostic, trouvent une erreur de 1 à 2 % seulement.

Ce résumé des conceptions actuelles sur le diagnostic des pneumococcies à l'étranger met en évidence le renseignement bien spécial qu'on demande au laboratoire. On ne demande pas une confirmation biologique d'un diagnostic de pneumonie *qui appartient à la clinique*, on sait l'impossibilité de comparer le pouvoir pathogène d'un microbe chez l'animal et chez l'homme, la difficulté de tirer une conclusion de la présence de pneumocoques dans une expectoration même s'ils sont pathogènes. Ce qu'on demande au laboratoire c'est la détermination *rapide* du type du pneumocoque contenu dans l'expectoration d'un malade atteint de pneumopathie aiguë.

II. — Expériences personnelles

Déductions pratiques

Nos recherches nous ont montré l'existence de deux méthodes excellentes pour le diagnostic rapide et précis des pneumococcies :

- l'épreuve du péritoine de la souris ;
- l'épreuve du gonflement de la capsule du pneumocoque dans un produit pathologique.

A. — Epreuve du péritoine de la souris.

Nous l'avons employée depuis plus de deux ans, chaque fois que nous avons rencontré en clinique un cas de pneu-

mococcie. C'est à son sujet que nous avons fait une étude analytique étendue de l'inoculation intra-péritonéale à la souris telle que nous l'avons présentée. Son principe est en effet la pullulation péritonéale des pneumocoques dès les premières heures de l'inoculation d'un produit pathologique.

C'est une méthode déjà ancienne proposée par Neufeld dès 1912, reprise et abrégée ces dernières années comme nous l'avons vu par R. Armstrong, Logan et Smeall, Sabin.

Les causes d'échecs peuvent être assez nombreuses au début lorsqu'on n'est pas prévenu des diverses modalités évolutives de l'infection et les tâtonnements sont fréquents : heures optima de sacrifice des souris, interprétation des frottis péritonéaux, modifications d'heure en heure inattendues (début puis arrêt de pullulation — ou au contraire absence de pullulation dans les premières heures et pullulation plus ou moins retardée), aléas des ponctions du péritoine. Nous n'avons trouvé que très rarement un liquide abondant dans le péritoine inoculé ; presque toujours la ponction ne ramène qu'une goutte (ou moins) de sérosité dans laquelle il est impossible de rechercher l'agglutination macroscopique ou microscopique surtout si l'on emploie les 32 types de sérums de diagnostic. C'est sur ce point que nous ne suivons pas, sauf cas exceptionnels, les auteurs anglais et américains et procédons un peu différemment.

Pour toutes ces causes d'errements que nous avons dû éliminer progressivement, nous croyons utile de présenter avec précision la technique à laquelle nous nous sommes arrêté et que nous pratiquons maintenant couramment.

On inocule *trois souris* avec 2/10 de cc. du produit pneumococcique à étudier (crachat, pus, crachat de lavage gastrique, liquide céphalo-rachidien) : deux dans la cavité péritonéale, une sous la peau avec les précautions déjà signalées. Chacune d'elle fait l'objet d'examens un peu différents. Dans les cas favorables, la première souris péritonéale peut suffire.

a) *La première souris péritonéale* est ponctionnée d'heure en heure de la troisième à la sixième heure. Parfois on réus-

sit à prélever une goutte de sérosité, plus souvent une trace infime. Ce prélèvement donne lieu aux examens suivants :

1. Frottis avec coloration de Gram pour étudier la morphologie et l'abondance des germes ;

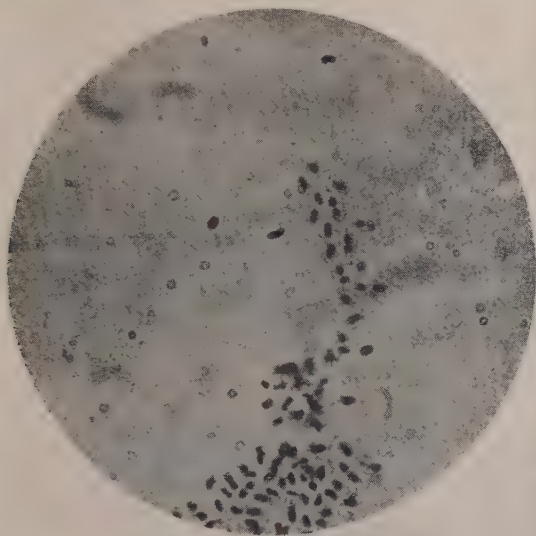


Fig. 9.

EPREUVE DU GONFLEMENT DE LA CAPSULE. Une souris est inoculée dans la cavité péritonéale avec 2/10 de centimètre cube d'une culture en bouillon T de vingt-quatre heures (pneumocoque 16).

Prélèvement de la sérosité péritonéale à la deuxième heure. Mise en contact avec une goutte de sérum spécifique 16 (sérum de lapin) et avec une goutte de bleu de Loeffler. On constate : 1° Immédiatement le gonflement très net de la capsule des pneumocoques ; 2° quelques minutes après, l'agglutination microscopique des germes (photomicrographie Ardoin, 1 $\times$ 1200).

2. S'il y a suffisamment de sérosité, recherche du gonflement de la capsule avec le sérum de lapin (cf. plus loin). On recherchera également l'agglutination microscopique à la condition que les germes soient assez nombreux (fig. 9).

b) *La deuxième souris péritonéale* est tuée à la sixième ou à la septième heure et autopsiée aseptiquement. On pratique les examens suivants :

1. Culture de la sérosité péritonéale en bouillon T.

2. Frottis avec coloration de Gram donnant ou non, selon les cas, les images de pullulation péritonéale (voir p. 88) (fig. 1, 2, 3).

3. La sérosité péritonéale est aspirée en totalité avec une pipette et placée dans un petit tube à hémolyse. La cavité péritonéale est lavée avec 1 ou 2 cc. de sérum physiologique qui est mélangé à la sérosité retirée initialement. On recherche sur le liquide assez abondant ainsi obtenu le gonflement de la capsule et l'agglutination simultanée s'il y a suffisamment de pneumocoques (fig. 9), sur laquelle on peut voir la netteté des images obtenues, ne prêtant guère à discussion, même si l'on ne possède pas une connaissance approfondie du pneumocoque.

c) *On laisse évoluer la pneumococcie de la souris inoculée sous la peau.* — Dans le cas de produit virulent elle meurt en 24 à 48 heures. On recherche la septicémie selon les règles classiques, sans omettre un frottis de la sérosité péritonéale dont nous avons souligné l'intérêt. Une culture du sang du cœur et une culture du cerveau sont pratiquées.

d) *Les cultures obtenues* servent les jours suivants à authentifier le pneumocoque.

Les résultats de l'épreuve du péritoine de la souris ainsi pratiquée ont toujours été remarquables par leur précision et leur rapidité lorsqu'il s'est agi d'un pneumocoque virulent. En *trois à sept heures* nous obtenons non seulement le témoignage de la virulence vraisemblable du germe par les images de pullulation, mais encore le *type* du pneumocoque pathogène. On peut ensuite tout à loisir faire l'étude du germe à l'aide des cultures obtenues (particulièrement avec la culture du cerveau). Insistons sur le fait que l'inoculation péritonéale a eu l'avantage dans la plupart des cas de débarrasser le produit pathologique souvent polymicrobien des

germes associés au pneumocoque. Cette épuration n'est pas constante mais de la plus haute utilité.

La méthode échoue lorsque le produit inoculé est avirulent. Dès les premières heures, la cavité péritonéale est nettoyée des germes agresseurs.

La méthode a été d'emploi plus difficile et en tout cas les résultats plus tardifs tant que nous n'avons disposé que des sérums de cheval classiques I, II, III. Non seulement nous avons souvent rencontré des germes inagglutinables, des agglutinations croisées, mais sauf dans certains cas rares l'agglutination était impossible à rechercher à partir de la sérosité péritonéale. On devait attendre le « départ » de la première culture pour pratiquer l'agglutination macroscopique : le résultat n'était obtenu dans la règle qu'après 18 ou 24 heures, exceptionnellement dans une même journée. Nous n'avons jamais observé le gonflement des capsules avec les sérums de cheval concentrés dont nous disposions.

B. — Epreuve du gonflement de la capsule dans les crachats — ou test de Neufeld.

Nous avons employé rigoureusement la technique de Neufeld (cf. p. 36) : une parcelle de crachat est intimement mélangée sur une lame avec une goutte de sérum de lapin et colorée avec une goutte de bleu de Loeffler.

Nous nous sommes servi, pour raccourcir le temps de l'examen, de sérums mélangés selon les groupes I, A, B, C, D, E, F, G, H, de Cooper (cf. p. 117).

Nous rapportons à titre d'exemples les résultats de l'épreuve faite chez 15 malades présentant une pneumopathie aiguë ou subaiguë.

M. S... entre à l'hôpital pour une pneumopathie aiguë extrêmement douloureuse, avec d'importantes manifestations pariétales de l'hémi-thorax droit rappelant la « fluxion » de poitrine. L'épreuve du péritoine montre la haute virulence du pneumocoque, les cultures sont lysées par la bile en deux minutes, aucune agglutination n'est décelable par les sérums de cheval habituels.

Dix-huit jours après son entrée, l'évolution est trainante, le malade crache encore un peu. L'expectoration est muco-purulente, contient des pneumocoques assez nombreux. La recherche du test de Neufeld sur les crachats est négative. L'épreuve du péritoine donne lieu à une pullulation importante des pneumocoques dès les premières heures ; la souris est sacrifiée à la septième heure. Sur l'exsudat péritonéal on recherche le test de Neufeld : en trois à quatre minutes, *les capsules apparaissent toutes gonflées et l'agglutination manifeste*, sous l'aspect de gros amas microbiens comparables à du fraic de grenouille (fig. 9) en présence du sérum XVI.

Le gonflement modifie totalement la morphologie des pneumocoques ; on ne retrouve plus l'étranglement capsulaire correspondant à l'étranglement du diplocoque, au contraire, le germe entouré de sa capsule apparaît elliptique, moins allongé que normalement, le corps microbien se ramasse au centre de la capsule ; au maximum, le pneumocoque est arrondi, centré par un point.

Le lendemain on reprend les mêmes examens : on ne réussit pas à mettre en évidence le test de Neufeld dans les crachats, mais on réussit très aisément le gonflement des capsules et l'agglutination dans la sérosité péritonéale d'une souris inoculée avec la culture quatre heures auparavant, par sa mise en présence avec le sérum XVI.

Dans les deux cas le gonflement et l'agglutination sont exclusivement obtenus avec le sérum XVI. Un essai d'agglutination macroscopique selon la technique de M. Nicolle avec une culture de 18 heures mise en contact avec les 32 sérums de diagnostic est exclusivement positif avec le sérum XVI.

M. H... présente une pneumopathie trainante para-hilaire droite de diagnostic incertain. L'expectoration muco-purulente renferme d'assez nombreux pneumocoques. Sur les crachats le test de Neufeld est négatif ; par contre, sur la sérosité péritonéale d'une souris inoculée quinze heures auparavant, le gonflement capsulaire et l'agglutination sont immédiats en présence du sérum X et exclusivement avec ce sérum.

M. X... présente une congestion pulmonaire grave, son expectoration est muco-purulente et renferme de nombreux pneumocoques. Le test de Neufeld sur les crachats est positif exclusivement au sérum I (le résultat est obtenu en quelques minutes) (fig. 10). L'épreuve du péritoine est pratiquée pour confirmation : la souris est sacrifiée à la deuxième heure, la sérosité péritonéale est

riche en pneumocoques qui s'agglutinent et gonflent sous l'action exclusive du sérum I.

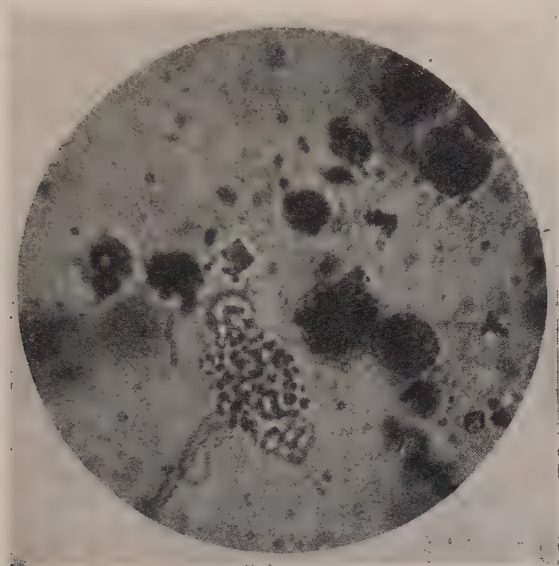


FIG. 10.

EPREUVE DU GONFLEMENT DE LA CAPSULE SUR LES CRACHATS D'UN PNEUMONIQUE.

Une parcelle de crachats est mélangée avec une goutte de sérum spécifique n° 1 et avec une goutte de Bleu de Loeffler. Sur la figure les pneumocoques gonflés et agglutinés en quelques minutes sont groupés en un amas dense un peu au-dessous du centre de la photomicrographie (Grossissement 1×1200).

M. Si... présente une pneumonie de la base droite, son expectoration rouillée est caractéristique et renferme de nombreux pneumocoques. Le test de Neufeld est exclusivement positif avec le sérum VII (résultat obtenu en moins d'une demi-heure). L'épreuve du péritoine pratiquée pour confirmation donne une agglutination et un gonflement capsulaire immédiats exclusivement avec le sérum VII.

M. A..., de race noire, est hospitalisé antérieurement au malade précédent, dans la même salle, pour une cardiopathie décompensée.

sée avec pleurésie droite. Quelques jours après l'hospitalisation de M. Si... il présente un foyer de congestion pulmonaire droite avec expectoration rouillée contenant des pneumocoques. Le test de Neufeld est positif exclusivement avec le *sérum VII* (résultat obtenu en moins d'une demi-heure). L'épreuve du péritoine de contrôle donne le gonflement capsulaire et l'agglutination microscopique exclusivement avec le *sérum VII*.

M. T... a présenté une pneumonie bâtarde, elle est guérie depuis sept jours lorsqu'on examine son expectoration rouillée pneumococcique. Le test de Neufeld dans les crachats est négatif. L'épreuve du péritoine est négative, on observe bien une pullulation modérée mais aucun gonflement en présence des sérums.

Mme R... est hospitalisée au cinquième jour d'une pneumonie franche lobaire aiguë de la base gauche. L'expectoration rouillée est caractéristique et contient de nombreux pneumocoques. Le test de Neufeld est obtenu en quinze minutes dans les crachats exclusivement avec le *sérum II*. L'épreuve du péritoine confirme le gonflement capsulaire et l'agglutination en présence du *sérum II* exclusivement.

M. Po... est hospitalisé pour une pneumonie de la base droite avec expectoration rouillée caractéristique. Le test de Neufeld dans les crachats est positif avec le *sérum XVIII* mais on remarque qu'une partie seulement des pneumocoques présente le gonflement capsulaire. L'épreuve du péritoine donne les mêmes résultats : le gonflement n'intéresse qu'une partie des pneumocoques en présence du *sérum XVIII*. On est tenté de conclure à la présence de deux types distincts de pneumocoques d'autant plus que le test de Neufeld sur une goutte de sérosité sanglante obtenue par ponction directe du bloc hépatisé donne les mêmes résultats. Le lendemain on reprend l'étude des crachats et on constate alors un gonflement capsulaire de tous les germes avec le *sérum XVIII*. L'épreuve du péritoine confirme l'existence d'un seul type de pneumocoques.

M. O... entre à l'hôpital pour un syndrome pneumonique aigu de la base droite. L'expectoration rouillée peu abondante n'apparaît qu'au septième jour. Le test de Neufeld est obtenu en moins de trente minutes dans les crachats exclusivement avec le *sérum XX*. L'épreuve du péritoine confirme le gonflement capsulaire et l'agglutination en présence du *sérum XX* exclusivement.

M. Am... est hospitalisé pour une congestion pulmonaire traînante de la base gauche. L'expectoration est légèrement rouillée, riche en mucine; elle contient d'assez nombreux pneumocoques. Le test de Neufeld est obtenu rapidement dans les crachats exclusivement avec le sérum XIV. L'épreuve du péritoine montre la pullulation, le gonflement capsulaire et l'agglutination en présence du sérum XIV exclusivement.

M. H... entre à l'hôpital pour une pneumonie massive de la base gauche dont l'évolution sera mortelle. L'expectoration tardive est rouillée, caractéristique. Le test de Neufeld est positif dans les crachats exclusivement avec le sérum I, le type I du pneumocoque est facilement confirmé par l'épreuve du péritoine.

M. M..., atteint de tuberculose pulmonaire évolutive, a une expectoration riche en bacilles de Koch. Le test de Neufeld pratiqué directement dans les crachats ne permet pas de déceler le type du pneumocoque. Par contre l'épreuve du péritoine montre en 4 heures environ une agglutination typique et exclusive avec le sérum XXXI.

M. Pi... entre à l'hôpital à la fin d'une pneumonie. Le test de Neufeld dans les crachats montre en quelques minutes qu'il s'agit d'un pneumocoque VIII. Le diagnostic du type est confirmé par l'épreuve du péritoine.

M. De... entre à l'hôpital pour une pneumonie grave qui se compliquera ultérieurement de phlébites des membres inférieurs, dont nous n'avons pu suivre l'évolution. Le test de Neufeld dans les crachats montre qu'il s'agit d'un pneumocoque XIV, diagnostic confirmé par l'épreuve du péritoine.

M. L... entre à l'hôpital pour une pneumonie d'intensité modérée. Le test de Neufeld montre qu'il s'agit d'un pneumocoque XIX, il est confirmé par l'épreuve du péritoine. Signalons un caractère biologique un peu particulier: le germe s'est montré doué d'une haute virulence pour la souris et au contraire avirulent pour le cobaye. On est tenté de faire un rapprochement avec l'existence de pneumopathies parfois épidémiques observées chez le cobaye qui seraient dues au pneumocoque XIX, hôte fréquent des voies aériennes supérieures du cobaye, et qui

seraient susceptibles de laisser après elles des immunités transitoires.

Sur 15 malades, nous avons obtenu chez 11 d'entre eux le diagnostic du type de pneumocoque par le test de Neufeld sur les crachats en une demi-heure environ, chez 3 autres nous l'avons obtenu en quelques heures par l'épreuve du péritoine de la souris, chez le dernier le type n'a pu être déterminé.

Comment peut-on expliquer les trois cas où le test de Neufeld dans les crachats a été négatif ? Le tableau clinique était très atténué chez les trois malades, la virulence des pneumocoques modérée, alors que dans les autres cas il s'agissait de processus pneumoniques aigus typiques. Il ne s'agit que de constatations, le nombre des malades étudiés est beaucoup trop restreint pour conclure. La raison, beaucoup plus simple, réside peut-être dans la petite quantité de sérum employé. G. Cooper s'est heurté au début de ses recherches à des résultats imparfaits du même ordre particulièrement dans le cas de pneumocoques peu virulents et a supprimé aisément ces faux pas de la méthode en employant une quantité de sérum plus importante. C'est un luxe que nous ne pouvons actuellement nous permettre, ne disposant que d'une quantité très limitée de sérum de diagnostic.

Le cas atypique du malade P..., où nous avons cru un moment à la présence de deux types de pneumocoques est peut-être expliqué lui aussi par la quantité insuffisante de sérum agglutinant mis en présence du crachat puisque le lendemain, dans une expérience pratiquée dans les mêmes conditions, on trouvait un gonflement capsulaire et une agglutination unique au sérum XVIII.

Enfin, nous retiendrons encore de l'étude de nos malades les cas particuliers des malades Si... et A... Chez ce dernier se pose le point d'interrogation d'une contagion du fait du voisinage et du même type de pneumocoque (VII) trouvé dans l'expectoration de chacun des malades. L'hypothèse est d'au-

tant plus plausible que la sensibilité particulière des races africaines au pneumocoque est un fait bien établi.

Le malade T... n'a pu être étudié suffisamment : nous n'avons eu qu'une expectoration à notre disposition.

Nous n'envisagerons pas dans ce travail, l'examen des expectorations de malades ne présentant pas de processus pneumococcique aigu. Les résultats obtenus par les méthodes de diagnostic rapide sont beaucoup plus inconstants et feront l'objet de recherches nouvelles.

En résumé, nous avons employé l'épreuve du péritoine de la souris dans un nombre de cas qui nous permet de conclure à sa valeur *toutes les fois qu'on est en présence d'une pneumococcie aiguë* : elle est à peu près infaillible si l'on dispose de sérums de lapin et permet un diagnostic en trois à six heures. L'épreuve du gonflement de la capsule dans les crachats au cours des processus pneumococciques aigus est presque toujours positive dans un temps très court, en une demi-heure en moyenne, mais ne permet ni d'avoir une idée du pouvoir pathogène chez l'animal ni de disposer de cultures pour une étude plus poussée.

Les deux méthodes loin de s'exclure se complètent heureusement, elles sont simultanément employées par les auteurs qui s'intéressent au diagnostic rapide des pneumococcies.

CHAPITRE VI

LE TRAITEMENT SÉROTHÉRAPIQUE
DES PNEUMOCOCCIES

Les premiers essais de sérothérapie antipneumococcique remontent aux Klemperer et à Elser en 1891. Ils sont suivis à l'étranger par de nombreux auteurs qui signalent d'incontestables succès. Neufeld et Händel, en 1909, apportent des améliorations : d'une part, en utilisant des sérums spécifiques préparés contre les pneumocoques I, II, III, d'autre part, en préconisant l'injection par voie intra-veineuse de doses élevées de sérum dès le début de la maladie. Les auteurs américains Avery, Cole, Dochez s'appliquent également à la mise au point de la sérothérapie. Ils ont un bon sérum contre le pneumocoque I, un sérum d'efficacité moyenne contre le II, un sérum médiocre contre le III. En France, de nombreuses observations relatives à l'emploi de la sérothérapie (sérum antipneumococcique polyvalent de l'Institut Pasteur) sont publiées à partir de 1916-1917 ; nous ne voulons rappeler ni leur diversité ni les résultats presque toujours concluants. Le fait que nous soulignons est la concordance des résultats obtenus par la plupart des auteurs qui ont employé la méthode : baisse rapide de la température, action sur le pouls, sur la diurèse, améliorations considérables en 24-48 heures de l'état général. Parfois la rétrocession des accidents évolue suivant le mode critique. Localement le foyer pneumonique persiste mais devient rapidement plus humide et son évolution se trouve également écourtée. Le taux de la mortalité baisse de façon importante.

Certes, les critiques soulevées sont nombreuses : la pneumonie est une maladie cyclique tournant court d'elle-même en quelques jours dans de nombreux cas ; les échecs de la sérothérapie, même en dehors de l'agent pathogène III, sont fréquents, ce sont surtout les cas favorables qui sont publiés ; la méthode n'est pas sans inconvénients (choc possible, maladie du sérum) qui, pour bénin qu'ils soient dans la règle, sont imprévisibles et créent un risque non proportionnel à l'évolution spontanée si souvent favorable.

A l'étranger, peut-être à cause de la sévérité plus grande des pneumopathies, la sérothérapie conserve son importance ; on s'attache à reconnaître au plus tôt le type du pneumocoque pathogène et l'on s'accorde de plus en plus sur les résultats favorables obtenus dans les cas où l'agglutination a montré un type pur II et surtout I. La sérothérapie contre le III est abandonnée par beaucoup.

En France, le traitement sérothérapique est délaissé progressivement. Le sérum polyvalent est employé dans les formes graves surtout à une phase tardive, à petites doses, par voie intra-musculaire, c'est-à-dire dans les conditions les plus défectueuses pour les défenseurs de la méthode. On ne s'attache pas à identifier rapidement le type de l'agent responsable en vue du traitement spécifique, élément essentiel du succès aux yeux des auteurs qui produisent des statistiques démonstratives.

La sérothérapie n'est pas modifiée dans ses grandes lignes tant que l'identification des pneumocoques est limitée aux groupes I, II, III. Elle prend un nouvel essor avec la vulgarisation de la classification de G. Cooper et la notion de types purs, à caractères constants, hautement pathogènes, parmi les types de l'ancien groupe IV. La possibilité d'une sérothérapie plus précise que précédemment se fait jour ; on prépare progressivement 17 sérums thérapeutiques correspondant aux 17 types pathogènes les plus souvent rencontrés et responsables de formes sévères. L'emploi de la sérothérapie ainsi comprise est étudié sur une grande échelle (3.066 cas de pneumonies dans une statistique de Bullowa) par les cliniciens américains (dont Cecil, Bullowa, Parks, Sappington) et anglais (dont Sabin, Corvan), qui arrivent à des conclusions littéralement enthousiastes.

Sans les faire nôtres, puisque nous ne disposons pas encore des moyens matériels permettant une étude approfondie des résultats susceptibles d'être obtenus dans les pneumopathies de notre pays, nous allons donner les conceptions, les techniques et les conclusions des auteurs étrangers défenseurs ardents de la sérothérapie.

« Quiconque, écrit Bullova, étudie les statistiques récentes se décidera facilement à employer du sérum dans le traitement des pneumopathies à pneumocoques et à ne pas se fier plus longtemps aux traitements médicamenteux usuels ».

De fait, le traitement sérothérapique spécifique, énergique et prudent, amène une diminution notable de la mortalité dont les tableaux suivants, pris parmi les statistiques publiées à l'étranger, fournissent des exemples typiques (les cas de pneumonie avec hémoculture positive sont indiqués en chiffres noirs.

Tableau I (Bullova)

Répartition des cas de pneumonie observés chez l'adulte du 1^{er} juillet 1928 au 30 juin 1935 avec indication de la mortalité en l'absence de sérothérapie.

Types	Total des cas	Pourcentage	Absence de sérothérapie					
			Nombre de cas		Cas mortels		Pourcent. des cas mortels	
I	725	23,6	82	19	23	15	28	78,9
II	256	8,3	116	51	52	39	44,8	76,5
III	297	9,7	214	60	88	58	41,4	96,7
IV	179	5,8	122	21	25	17	2,05	81
V	230	7,5	147	34	27	19	18,4	55,9
VI	51	1,7	38	5	7	3	18,4	60
VII	194	6,3	144	31	26	10	18,1	66,7
VIII	225	7,3	163	36	22	13	13,5	41,9
IX	69	2,3	54	6	12	4	22,2	66,7
X	17	0,6	13	0	2	0	15,4	0
XI	18	0,6	18	1	4	1	22,2	100
XII	32	1	32	11	8	8	24	72,7
XIII	31	1	27	0	5	0	18,5	0
XIV	87	2,2	72	20	23	15	31,9	75
XV	11	0,4	11	2	4	1	36,4	50
XVI	17	0,6	17	1	4	1	23,5	100
XVII	19	0,6	19	2	6	1	31,6	50
XVIII	63	2,1	51	10	12	7	23,5	70
XIX	40	1,3	31	9	10	7	32,3	77,8
XX	33	1,1	31	5	5	3	16,1	60
XXI	18	0,6	18	2	2	1	11,1	50
XXII	20	0,7	19	1	1	0	5,3	0
XXIII	11	0,4	11	3	4	2	36,4	66,7
XXIV	12	0,4	12	3	2	1	16,7	33,3
XXV	11	0,4	11	3	1	1	9,1	33,3
XXVII	4	0,1	4	0	0	0	0	0
XXVIII	9	0,3	9	0	1	1	11,1	0
XXIX	14	0,5	14	1	2	1	14,3	100
XXX	4	0,1	4	0	0	0	0	0,3
XXXI	5	0,2	5	0	1	0	2	0
XXXII	5	0,2	6	1,7	0	0	0	0
Groupe X	257	8,4	257	27	55	10	21,4	58,8
Cas à types multiples	102	3,3	55	21	23	18	41,6	66,7
	3066		1827	355	457	256	25	72,1

Tableau II (Bullova).

TYPES I et II. — Résultats de la sérothérapie dans les cas de pneumonie du tableau précédent.

Types	Nombre de cas	Pourcentage	Sérothérapie					
			Total des cas		Cas mortels		Pourcent. des cas mortels	
I	725	23,6	643	153	89	63	13,8	41,2
II	256	8,3	140	53	47	39	33,6	67,9

Tableau III (Bullova)

TYPE I. — Statistique des cas de pneumonie observés chez l'adulte de juillet 1933 à juillet 1934.

Total des cas	Pour- centage	Absence de sérothérapie				Sérothérapie							
		Nombre de cas		Cas mortels		Pourcent. des cas mortels		Nombre de cas		Cas mortels		Pourcent. des cas mortels	
116	23,7	2	1	1	1	50	100	114	21	17	9	14,9	42,5

Tableau IV (Bullova)

TYPE II. — Statistique des cas de pneumonie observés chez l'adulte de janvier 1933 à juillet 1934.

Total des cas	Pour- centage	Absence de sérothérapie				Sérothérapie							
		Nombre de cas		Cas mortels		Pourcent. des cas mortels		Nombre de cas		Cas mortels		Pourcent. des cas mortels	
32	6,5	11	5	6	3	54,5	60	21	5	4	3	19	60

Tableau V (Bullova)

TYPE I. — Statistique de 112 cas de pneumonie dans lesquels la sérothérapie a été mise en œuvre une fois sur deux.

Sérothérapie				Pourcentage	Absence de sérothérapie				Pourcentage		
Nombre de cas		Cas mortels			Nombre de cas		Cas mortels				
58	28	13	11	22	39	34	22	19	18	35	82

Tableau VI (Bullova)

TYPE I. — Résultats de la sérothérapie dans 532 cas de pneumonie suivant le jour de la mise en œuvre du traitement.

Jour du traitement sérothérapique	Nombre total des cas			Nombre de cas avec bactériémie		
	Cas	Cas mortels	Pourcent. des cas mortels	Cas	Cas mortels	Pourcent. des cas mortels
1	13	0	0	1	0	
2	53	3	5,7	14	3	21
3	73	8	10,9	12	4	33
4	86	12	11,7	23	9	39
5	91	17	18,6	30	13	34
6	80	15	18,7	23	11	48
7	51	14	27,4	16	9	56
8 et plus	85	20	23,5	17	11	65
	532	89	16,7	136	60	44

Exposons brièvement les caractéristiques des sérums employés. Ils ont été préparés pour les types I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XIII, XIV, XV, XVII, XX, XXII, XXIII. Leur pouvoir est calculé en unités par cc. Par convention, une unité est dix fois la plus petite dose de sérum protégeant la souris contre cent mille fois la dose minima mortelle d'une souche pneumococcique. Un lot de sérums pour chaque type est soigneusement titré et adopté comme standard, à chaque essai de titrage on éprouve à nouveau le sérum standard. Les sérums des différents types ayant la même valeur en unités n'ont pas nécessairement la même activité thérapeutique : d'une part, les différents types n'ont pas la même virulence pour la souris ; d'autre part, la virulence des pneumocoques pour la souris ne correspond pas à leur virulence chez l'homme. Les estimations en unités

n'ont de valeur que parce qu'elles permettent la comparaison du pouvoir relatif des différents sérums du même type. La valeur comparée des sérums des différents types dans le traitement de la pneumonie humaine ne peut être établie que par les essais cliniques.

Le sérum de type I doit avoir un pouvoir minimum tel que 0,2 cc. de ce sérum protège la souris contre 0,1 cc. d'une culture hautement virulente, ce qui équivaut de 50 à 100 unités par cc. Par l'immunisation prolongée de chevaux (8 mois et plus), on a pu obtenir un sérum de type I ayant de 1.000 à 4.000 unités par cc.; des sérums ayant jusqu'à 2.000 unités pour les autres types. Le sérum concentré est naturellement plus efficace. Actuellement on exige un minimum de 500 unités par cc. pour les types I et II. La stimulation des anticorps chez les chevaux inoculés avec les types IV à XXXII est en général semblable à celle produite avec les types I et II autant qu'on en puisse juger par l'agglutination, la précipitation, les tests de protection sur la souris. Aucun sérum actif n'a été aussi difficile à obtenir que le sérum du type III.

La nécessité d'employer une sérothérapie spécifique est magistralement démontrée par l'expérience suivante : *un sérum de type I ou II ayant 1.000 à 2.000 unités protectrices pour le type correspondant a moins de une unité protectrice contre les types hétérologues* comme on a pu le calculer en employant les tests sur la souris. Si l'on fait cette expérience sur les sérums des types qui donnent une agglutination croisée on met encore en évidence la valeur de la sérothérapie spécifique : le plus haut pouvoir de protection croisée rencontrée (celui du sérum II contre le type V) *est extrêmement faible, vingt unités par cc. contre 1.000 unités et plus pour le type homologue.*

Envisageons maintenant les conditions et la conduite de cette sérothérapie.

Les conditions sont les suivantes :

Il ne faut plus se contenter de porter le diagnostic de pneumonie droite ou gauche, il faut établir le plus rapidement possible le diagnostic du type étiologique. Ce type est

facilement et rapidement déterminé dans l'expectoration, en quelques minutes dans les cas très faciles, en moins de 18 heures dans les cas les plus défavorables. Il faut obtenir dès que possible des crachats et les étudier immédiatement au laboratoire. Le résultat ainsi acquis « n'est pas moins précieux pour le médecin qui traite une pneumonie que ne l'est la connaissance du groupe sanguin dans une hémorragie grave, l'examen des urines et des humeurs dans un coma diabétique, elle est peut-être plus importante qu'une numération leucocytaire dans les affections abdominales aiguës ». Une hémoculture est faite et doit être répétée ultérieurement pour suivre l'évolution : elle a deux intérêts, le premier est un intérêt pronostique, une hémoculture positive montrant plus de cinquante colonies par cc. indique un pronostic à peu près fatal, le deuxième est un intérêt thérapeutique, une hémoculture positive étant l'indication de répéter et d'augmenter les doses de sérum.

La sérothérapie, pour être efficace, est soumise à deux conditions primordiales : elle doit être spécifique et précoce. La possibilité d'une guérison sans sérothérapie ne doit pas causer un retard dans l'application du traitement, jusqu'à l'apparition d'une aggravation ou d'une complication. « On attend du chirurgien qu'il enlève l'appendice enflammé mais non perforé et qu'il évite l'abcès et la péritonite du cinquième jour. Il faut exiger du médecin la même habileté dans le diagnostic étiologique du type et la même énergie pour la mise en œuvre de la sérothérapie ». Dans les centres médicaux des Etats-Unis, la pneumonie est pour le médecin de garde une affection à traiter d'urgence ; l'organisation lui permet de commencer de jour ou de nuit l'administration de sérum spécifique dans les trois heures qui suivent l'hospitalisation du malade.

La conduite du traitement est la suivante :

Dans les cas pris au début, sans hémoculture positive, il faut injecter par voie intra-veineuse une dose totale de 190.000 unités en une fois pour les types I et VII ; de plus grandes doses sont exigées pour le type II tandis que le

type VIII est à traiter avec des doses plus petites. Pour les autres types, les doses ne sont pas précisées et varient avec chaque cas particulier. Huit à vingt-quatre heures après le commencement du traitement, la température et le pouls doivent être approximativement normaux ; la température peut baisser plus lentement que le pouls mais peut aussi précéder le ralentissement du pouls.

Dans les cas graves avec hémoculture positive, il faut injecter par voie intra-veineuse le sérum toutes les deux heures, 40.000 unités par injection. Le problème consiste à donner le plus possible d'unités dans le temps le plus bref, dans les cas précoces, 2 à 3 doses peuvent suffire. Le meilleur point de repère clinique pour une sérothérapie suffisante est l'abaissement du pouls à la normale et la sédation de la température. Dans les formes résistantes, 36 à 40 heures de traitement peuvent être nécessaires.

Si la détermination du type se heurte à des impossibilités matérielles ou est retardée, on devra commencer une sérothérapie du type I et II, types qui représentent 50 % des cas. Mais le médecin doit avoir présent à l'esprit que ce traitement est sans valeur dans la moitié des cas environ).

Il existe une méthode simple pour déterminer les agglutinines du sang et par conséquent la dose suffisante de sérum. On les recherche deux à quatre heures après chaque injection de sérum. Le procédé consiste à déposer sur une lame quelques gouttes de sang pris au doigt ; le sang est mélangé à une suspension du type de pneumocoque en cause, fixé par la chaleur, coloré par une solution diluée de fuchsine et décoloré par l'acide acétique. Les germes de la suspension sont complètement agglutinés si des quantités suffisantes de sérum ont été injectées. On ne doit pas cesser la sérothérapie avant que la plupart des organismes n'apparaissent agglutinés dans la réaction.

Dans le même ordre d'idée on a signalé l'intérêt du test cutané pratiqué avec le polysaccharide, spécifique du type du pneumocoque, pour suivre l'évolution. L'intra-dermo-réaction est négative tant que les anticorps spécifiques du

type n'existent pas dans le sang ; c'est une indication de continuer la sérothérapie. Lorsqu'elle est positive, son maximum apparaît de la quinzième à la trentième minute, elle indique que la guérison s'annonce, donc que la sérothérapie peut être cessée (Th. Francis).

Les accidents sériques constituent un des arguments contre le traitement. On doit s'efforcer de les éviter. On emploiera la sérothérapie chez les sujets ayant eu auparavant des injections de sérum, en injectant initialement de petites quantités. On pourra étudier dans tous les cas la sensibilité du sujet par l'ophtalmo-réaction en utilisant du sérum dilué au 1/10. Si le sujet est hypersensible au point de ne pouvoir supporter l'injection d'albumines étrangères, on trouve dans l'espace d'un quart d'heure une réaction conjonctivale nettement positive. Elle constitue une contre-indication absolue à la sérothérapie.

Dans les cas où l'on redoute des accidents sériques, on peut employer la méthode suivante : 0,5 cc. d'adrénaline sont injectés six minutes avant le sérum, la dose initiale de sérum de un cc. est injectée lentement en trois à cinq minutes. Une heure plus tard, on répète cette dose après avoir fait au préalable une nouvelle injection d'adrénaline. Si, après la deuxième injection de sérum, il n'y a pas d'incident on peut injecter la quantité thérapeutique usuelle, après injection préalable pour la troisième fois d'adrénaline.

Les réactions sont peu fréquentes et plus bénignes si l'on a à sa disposition des séries de sérums concentrés pauvres en albumine (purifiés).

Telles sont les idées admises couramment par les auteurs étrangers, justifiées par les résultats signalés dans leurs statistiques. Le lecteur français ne peut qu'être surpris. Doit-on cacher notre inertie derrière un septicisme qui va à l'encontre de tout progrès, derrière des objections depuis toujours présentées qui vont contre des faits ? Nous pensons que bien des pneumopathies à pneumocoques sont graves, compliquées, et peuvent « ne pas guérir toutes seules ». Le problème doit être résolu. Ce fut une des idées directrices de

notre travail et nous croyons avoir fait œuvre utile en étudiant l'intérêt du diagnostic rapide des pneumococcies, en soulignant sa rigueur suffisante, en présentant la facilité de son emploi pour tout clinicien. Ce n'est là, évidemment, que le point de départ de la sérothérapie. Il est impossible de traiter actuellement en France, des malades atteints de pneumopathie à pneumocoque d'une façon suffisamment rigoureuse pour juger de l'efficacité de cette méthode. On se heurte à deux obstacles matériels insurmontables : l'absence de sérums de diagnostic, l'absence de sérums thérapeutiques spécifiques concentrés et purifiés. C'est sur ces points que porteront nos efforts ultérieurs.

CONCLUSIONS

Le pneumocoque et les infections pneumococciques ont donné lieu à l'étranger à de très nombreux travaux dans ces quinze dernières années. Ils sont généralement peu connus en France et restent, chez nous, sans applications pratiques.

Les recherches personnelles que nous poursuivons depuis deux ans nous ont confirmé l'importance des données nouvelles *sur la pathologie expérimentale et comparée, sur la classification des pneumocoques, sur les méthodes de diagnostic rapide et précis des affections pneumococciques.*

I. — PATHOLOGIE EXPÉRIMENTALE ET COMPARÉE.

1° L'inoculation d'un produit pneumococcique *dans le péritoine* de la souris enrichit et précise la méthode classique de l'inoculation par voie sous-cutanée, la seule communément employée en France.

L'étude cyto-bactériologique de l'exsudat péritonéal de souris inoculées dans les mêmes conditions et sacrifiées d'heure en heure, réalise un véritable « film » du comportement de la souris à l'égard des germes agresseurs. Cinq éventualités sont possibles : pullulation retardée ; phase de guérison locale puis réensemencement septicémique ; guérison apparente cependant qu'évolue une pneumococcie prolongée latente ; guérison vraie.

L'inoculation par la voie intra-péritonéale est indispensable au diagnostic des pneumococcies ; en outre, elle permet très souvent d'épurer un produit pathologique pneumococcique où d'autres germes sont associés, ces derniers disparaissant de la cavité péritonéale dans les premières heures.

2° L'instillation de germes dans les narines d'un animal sous narcose est une technique récente très précieuse pour l'inoculation par la voie respiratoire. Nous avons réalisé avec elle des *broncho-pneumonies expérimentales typiques* débutant par des lésions d'alvéolite catarrhale puis suppurée.

3° Quelle que soit la voie d'inoculation les lésions anatomiques sont très précoces et très importantes dans *le foie*

où elles prédominent initialement dans la partie moyenne des lobules. Les lésions spléniques et rénales sont moins intenses et plus tardives. Les poumons, si l'on excepte les cas d'inoculation par voie respiratoire, n'ont que des lésions congestives jusqu'à la phase ultime de la septicémie ; ce fait semble prouver l'absence de « pneumotropisme » du pneumocoque chez la souris.

4° Dans le domaine de la pathologie comparée, nous avons montré l'existence d'une *pneumococcie prolongée de la souris* qui évolue sous une forme latente, comme si les germes étaient simplement hébergés par certains tissus de l'animal. La fréquence (quatre fois sur cinq) avec laquelle dans ces cas le pneumocoque est obtenu par culture du cerveau à l'exclusion des autres viscères et du sang, exprime une localisation nerveuse du germe dont l'intérêt en pathologie générale doit être souligné.

II. — LA CLASSIFICATION DES PNEUMOCOQUES.

La répartition des pneumocoques en trente-deux types proposée par C. Cooper est du plus haut intérêt tant la spécificité et les propriétés immunologiques de chaque type sont nettes. Les épreuves du gonflement de la capsule, de l'agglutination microscopique et macroscopique sont des moyens simples de les reconnaître et à la portée de tout laboratoire à condition de posséder les sérums spécifiques de lapins spécialement préparés dans ce but de diagnostic.

III. — LE DIAGNOSTIC RAPIDE ET PRÉCIS DES PNEUMOCOCCIES.

Si le diagnostic de la nature pneumococcique d'une affection appartient très souvent à la clinique, on dispose actuellement de moyens simples pour établir dans tous les cas un diagnostic biologique rapide avec détermination du type du pneumocoque en cause.

Après de nombreux essais, nous avons proposé de régler ainsi la technique d'un diagnostic rapide :

1° Recherche du gonflement de la capsule des pneumoco-

ques du produit pathologique (crachat, pus), en soumettant directement les germes à l'action des trente-deux sérums spécifiques.

2° Simultanément, *épreuve du péritoine de la souris*, inoculation de 2/10 de cc. du produit dans le péritoine de deux souris et à la base de la queue d'une troisième.

L'exsudat péritonéal de la première souris inoculée dans le péritoine est prélevé par ponction d'heure en heure. La deuxième souris inoculée dans le péritoine est sacrifiée de la troisième à la cinquième heure selon les cas, on ensemence en bouillon T une trace de l'exsudat péritonéal puis on le recueille en totalité. La troisième souris est sacrifiée dès qu'elle semble malade ; on y met en évidence la septicémie et on ensemence sur divers milieux le sang du cœur et le cerveau.

Sur l'exsudat péritonéal retiré des deux premières souris on identifie le type du pneumocoque en le soumettant à l'action des sérums spécifiques. *Non seulement le gonflement de la capsule est caractéristique mais l'agglutination microscopique des germes est manifeste* dès qu'ils sont suffisamment nombreux.

3° L'étude bactériologique du germe est faite sur les cultures obtenues par l'ensemencement de la sérosité péritonéale des deux premières souris et par l'ensemencement du sang du cœur et du cerveau de la souris inoculée sous la peau. Les premières cultures peuvent être étudiées dans les cas favorables dès la huitième heure. On identifie le pneumocoque par les moyens habituels : étude morphologique, caractères des cultures sur milieux divers, lyse biliaire, agglutination macroscopique, réinoculations.

L'épreuve du gonflement de la capsule donne le type du pneumocoque en cause dans un délai variant de cinq à trente minutes. Si le pneumocoque est virulent, elle est presque toujours positive. *L'épreuve du péritoine de la souris* complète la première, elle met en évidence le pouvoir pathogène du germe, le type du pneumocoque par le gonflement de la

capsule et l'agglutination microscopique, dans un délai variant de trois à cinq heures.

La troisième série de recherches permet l'authentification définitive du germe dans un délai variant de huit à trente-six heures.

Les critiques que, d'un point de vue bactériologique théorique, on pourrait adresser à ces épreuves, ne tiennent pas, en pratique, devant les qualités de rapidité et de précision que nous avons mises en évidence.

L'intérêt pratique de ces méthodes découle de la spécificité des types de pneumocoques qui ouvre un jour nouveau sur les possibilités de la sérothérapie très en faveur en Allemagne et dans les pays anglo-saxons. L'absence de sérums thérapeutiques spécifiques et les difficultés matérielles pour s'en procurer ne nous ont pas encore permis de nous faire une opinion.

Vu :

LE DOYEN,
ROUSSY.

Vu :

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE
FIESSINGER.

Vu et permis d'imprimer :

LE RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS,
S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

- ARMSTRONG (Richard R.). — Méthode simple et rapide d'identification des pneumocoques (*The British Medical Journal*, 7 févr. 1931, p. 214).
- Caractérisation immédiate du groupe des pneumocoques (*The British Medical Journal*, 30 janv. 1932, p. 187).
- AVERY (O. T.) and MORGAN (H. J.). — Immunological reactions of the isolated carbohydrate and protein of pneumococcus (*J. of Exp. Med.*, vol. 42, 1925, p. 347-352).
- AVERY (O. T.), GÆBEL (W. F.), BABERS (F. H.). — Immunological specificity of antigens prepared by combining α and β glucosides of glucose with proteins (*J. of Exp. Med.*, vol. 55, 1932, p. 769-780).
- AVERY (O. T.), GÆBEL (W. F.). — The isolation and properties of the acetyl-polysaccharide of pneumococcus type I. (*J. of Exp. Med.*, vol. 58, 1933, p. 731-755).
- AVERY (O. T.). — Voir :
- DERNBY (K. G.) and AVERY (O. T.).
 - DOCHEZ and AVERY (O. T.).
 - DUBOS (R.) and AVERY (O. T.).
 - GÆBEL (W. F.) and AVERY (O. T.).
 - GÆBEL (W. F.), BABERS (F. H.), AVERY (O. T.).
 - GÆBEL (W. F.), AVERY (O. T.), BABERS (F. H.).
 - HEIDELBERGER and AVERY.
 - HEIDELBERGER (M.), GÆBEL (W. F.), AVERY (O. T.).
- BABERS (F. H.). — Voir :
- AVERY (O. T.), GÆBEL (W. F.), BABERS (F. H.).
 - GÆBEL (W. F.), BABERS (F. H.), AVERY (O. T.).
 - GÆBEL (W. F.), AVERY (O. T.), BABERS (F. H.).
- BARIÉTY (M.). — Voir :
- TROISIER (J.), BARIÉTY (M.) et BROUET (G.), 1935 (1).
 - TROISIER (J.), BARIÉTY (M.) et BROUET (G.), 1935 (2).
 - TROISIER (J.), BARIÉTY (M.) et BROUET (G.), 1936.
 - TROISIER (J.), BARIÉTY (M.) et BROUET (G.), 1936.
 - TROISIER (J.), BARIÉTY (M.) et BROUET (G.), 1937.

- BEZANÇON et GRIFFON. — Réaction agglutinante dans les infections à pneumocoques (*Annales de l'Institut Pasteur*, juillet 1900).
- BEZANÇON et DE JONG (I.). — Article « Pneumococcie » in *Nouveau Traité de Médecine et de Thérapeutique*.
- BLAKE (F. G.). — Methods for the determination of pneumococcus types (*J. of Exp. Med.*, 1917, vol. 26, p. 67).
- BLAKE and CECIL. — Pathology and pathogenesis of pneumococcus lobar pneumonia in monkey (*J. of Exp. Med.*, vol. 31, p. 445, 1925).
- BLANC (N. E.). — Voir :
COOPER (G.), MISHULOW and BLANC.
- BRANCH. — Voir :
STILLMAN (E. G.) and BRANCH, 1924.
STILLMANN (E. G.) and BRANCH, 1930.
- BROUET (G.). — Voir :
TROISIER (J.), BARIÉTY (M.), BROUET (G.), 1935 (1).
TROISIER (J.), BARIÉTY (M.), BROUET (G.), 1935 (2).
TROISIER (J.), BARIÉTY (M.), BROUET (G.), 1936.
TROISIER (J.), BARIÉTY (M.), BROUET (G.), 1937 (1).
TROISIER (J.), BARIÉTY (M.), BROUET (G.), 1937 (2).
- BULLOWA (J.). — The reliability of sputum typing and its relation to serumtherapy (*J. Am. Med. Ass.*, vol. 105, 9 novembre 1935, p. 1512-1518).
- Voranssetzungen und Technik der Pneumoniebehandlung (*Klin. Wochenschrift.*, n° 22, 30 mai 1936, p. 769-775).
- BUTLER (K. M.). — Voir :
WADSWORTH (A. B.) and BUTLER (K. M.).
- CECIL (R. L.) and PLUMMER (N.). — Pneumococcus type II pneumonia (*J. Am. Med. Ass.*, vol. 98, 1932, p. 779).
- CECIL (R. L.). — Voir :
BLAKE and CECIL.
- CHICKERNING (H. T.). — Agglutination in lobar pneumonia (*J. of Exp. Med.*, vol. 20, 1914, p. 599).
- The concentration of the protective bodies in antipneumococcus serum-specific precipitate extracts (*J. of Exp. Med.*, vol. 22, 1915, p. 248-267).
- CLOUGH (M. C.). — (*Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1917, t. 28, p. 316, cité par COOPER (G.), 1929).
- A study of pneumococci reacting with antipneumococcus sera of types I, II, III with on observation of a mutation of one of the strains (*Journ. of Exp. Med.*, v. 30, 1919, p. 123-146).

CLOW. — Voir :

WEBSTER and CLOW.

COLE (R.). — Pneumococcus infection and lobar pneumonia (*Arch. of Int. Med.*, 1914, vol. 14, p. 56-93).

— Pneumococcus infection and immunity (*New-York Med. Journ.*, 1915, n° 1).

COOPER (G.), MISHULOW (L.) and BLANC (N. E.). — A study of the serological relationships of Pneumococci from the upper respiratory tract with special reference to common colds and influenzal conditions (*J. Immunol.*, 1931, vol. 6, p. 25).

COOPER (G.), EDWARDS (M.), ROSENSTEIN (C.). — The separation of types among the pneumococci hitherto called group IV and the development of therapeutic antisera for these types (*J. of Exp. Med.*, vol. 49, 1929, p. 461-474).

COOPER (G.), ROSENSTEIN (C.), WALTER (A.), PEIZER (L.). — The further separation of types among the pneumococci hitherto included in group IV and the development of the therapeutic antisera for these types (*Journ. of Exp. Med.*, vol. 55, 1932, p. 531-554).

COOPER (G.) and WALTER (A. W.). — Application of the Neufeld Reaction to the Identification of types of Pneumococci (*Am. Journ. of Public Health*, vol. 25, n° 4, april 1935, p. 469-474).

COTONI (L.). — La virulence des pneumocoques (*Thèse Paris*, 1912).

COTONI et TRUCHE (C.). — Agglutination des pneumocoques humains et animaux (*Ann. Institut Pasteur*, avril 1912).

COTONI (L.), TRUCHE (C.) et Mlle RAPHAEL. — Pneumocoques et affections pneumococciques (*Monographie de l'Institut Pasteur*, Masson, 1922).

COTONI (L.). — (In *Traité de Nattan-Larrier*. Article « Pneumocoque », livre III, p. 834-878).

DEBAINS (E.). — Voir :

NICOLLE (M.), JOUAN et DEBAINS, 1918.

NICOLLE (M.) et DEBAINS (E.), 1919.

NICOLLE (M.) et DEBAINS (E.), 1920.

DERNBY (K. G.) and AVERY (O. T.). — The optimum hydrogen ion concentration for the growth of pneumococcus (*J. of Exp. Med.*, vol. 28, 1918, p. 345-357).

DOCHEZ and AVERY (O. T.). — The elaboration of specific soluble substance by the pneumococcus during growth (*J. of Exp. Med.*, vol. 26, 1917, p. 477-493).

- DOCHETZ (A. R.) and GILLESPIE (L.). — Biological classification of pneumococci by means of immunity reactions (*J. of the Am. Med. Ass.*, 1913, vol. 51, n° 10, p. 727).
- DOPTER et SACQUÉPÉE (E.). — (*Précis de Bactériologie*, 4^e édition Paris, 1931, livre I, p. 394. Baillard, édit.).
- DUBOS (R.) and AVERY (O. T.). — Decomposition of the capsular polysaccharide of pneumococcus type III by a bacterial enzyme (*J. of Exp. Med.*, vol. 54, 1931, p. 53-71).
- DUBOS (R.). — Factors affecting the yield of specific enzyme in culture of the bacillus decomposing the capsular polysaccharide of type III pneumococcus (*J. of Exp. Med.*, vol. 55, 1932, p. 376-391).
- Studies on the mechanism of production of a specific bacterial enzyme which decomposes the capsular polysaccharide of type III pneumococcus (*J. of Exp. Med.*, vol. 62, 1935, p. 259-269 et 270-279).
- EDWARDS (H.). — Voir :
- COOPER (G.), EDWARDS (M.), ROSENSTEIN (C.), 1919.
- ETINGER-TULCZYNSKA (R.). — Capsules bactériennes et réaction de gonflement (*Zeitsch. of Hyg.*, vol. 114, 1932-1933, p. 769-789).
- Die Prüfung des Pneumokokkenheilserums inn Mäuseversuch bei schonbestehender örtlicher und allgemeininfektion (*Zeits. f. Hyg.*, vol. 115, 1933, p. 608-615).
- Voir :
- NEUFELD und ETINGER-TULCZYNSKA, 1930.
- NEUFELD und ETINGER-TULCZYNSKA, 1931.
- NEUFELD und ETINGER-TULCZYNSKA, 1932-33.
- NEUFELD und ETINGER-TULCZYNSKA, 1933 (1).
- NEUFELD und ETINGER-TULCZYNSKA, 1933 (2).
- FRANCIS (Th. J.). — The value of the skin test with type specific capsular polysaccharide in the serum treatment of type I pneumococcus pneumonia.
- GOEBEL (W. F.) and AVERY (O. T.). — The synthesis of the p-aminobenzyl ether of the soluble specific substance of type III pneumococcus and its compling with protein (*J. of Exp. Med.*, vol. 54, 1931, p. 431-436 et 437-447).
- GOEBEL (W. F.), BABERS (F. H.), AVERY (O. T.). — The influence of the acetyl group on the specificity of hexoside protein antigens (*J. of Exp. Med.*, 1934, vol. 60, p. 85-94).

- GØEBEL (W. F.), AVERY (O. T.), BABERS (F. H.). — The specificity of antigens prepared by combining the *p. aminophenol* glucosides of disaccharides with protein (*J. of Exp. Med.*, vol. 60, 1934, p. 799-617).
- GØEBEL (W. F.). — Voir :
- AVERY (O. T.), GØEBEL (F.), BABERS.
 - AVERY (O. T.), GØEBEL (W. F.).
 - HEIDELBERGER (M.), GØEBEL (W. F.), AVERY (O. T.).
- GOODNER, KENNETH and HORSFALL. — The protective action of type I antipneumococcus serum in mice (*J. of Exp. Med.*, vol. 64, 1936, p. 369).
- GRENIER. — Etude sur le pneumocoque d'origine animale. Virulence pour la souris, conservation de cette virulence (*Ann. Institut Pasteur*, vol. 26, 1912, p. 5).
- GRIFFITH (F.). — Reports on public health and medical subjects (*Ministry of Health London*, N° 13, 1922, p. 20).
- GRIFFON. — Voir :
- BEZANÇON et GRIFFON.
- GUNDEL (Max). — Zur Bakteriologie und Typenlehre der Pneumokokkenkrankungen (*Arch. für Hyg. und Bakter.*, vol. 114, 1935, pp. 33-36).
- HAENDEL. — Voir :
- NEUFELD und HAENDEL, 1909.
- HEIDELBERGER (M.) and AVERY (O. T.). — The soluble specific substance of pneumococcus (*J. of Exp. Med.*, vol. 38, 1923, pp. 73-80).
- Immunological relationships of cell constituents of pneumococcus. (*J. of Exp. Med.*, vol. 38, 1923, pp. 80-85).
- HEIDELBERGER (M.), GØEBEL (W. F.) and AVERY (O. T.). — The soluble specific substance of pneumococcus. (*J. of Exp. Med.*, 1925, vol. 42, pp. 727-745).
- HEIDELBERGER (M.). — Pneumococcus type III (in *Chemical nature of immune substances*, 1927, p. 107).
- HEIDELBERGER (M.) and KENDALL (F. E.). — Specific and non specific polysaccharides of type IV pneumococcus. (*J. of Exp. Med.*, vol. 53, 1931, pp. 625-639).
- The precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and homologous antibody (*J. of Exp. Med.*, vol. 61, 1935, pp. 559-591).
 - The dissociation of Precipitates formed by pneumococcus specific polysaccharides and homologous antibodies (*J. of Exp. Med.*, vol. 64, 1936, n° 2, p. 161).

- HEIDELBERGER (M.), KENDALL (F. E.) and SCHERP. — Polysaccharides of types I, II, III (*J. of Exp. Med.*, vol. 64, 1936, p. 559).
- HELGA KUHN. — Voir :
NEUFELD und HELGA KUHN, 1935.
NEUFELD und HELGA KUHN, 1936.
- HORSFALL. — Voir :
GOODNER, KENNETH and HORSFALL.
- HUGHES. — Voir :
WEBSTER and HUGHES.
- JONG (I. DE). — Voir :
BEZANÇON et I. DE JONG.
- JOUAN. — Voir :
M. NICOLLE, JOUAN et DEBAINS.
- KENDALL (F. E.). — Voir :
HEIDELBERGER (M.) and KENDALL (F. E.), 1931.
HEIDELBERGER (M.) and KENDALL (F. E.), 1936.
HEIDELBERGER and KENDALL, 1936.
- KENNETH. — Voir :
GOODNER KENNETH and HORSFALL.
- KLEMPERER (G. et F.). — Recherches sur l'immunisation et la guérison dans les infections pneumococciques. (*Berl. Klin. Woch.*, 1891, n^{os} 34-35).
- LANGE. — Weitere Untersuchungen über die Bedeutung der Staubinfektion bei der Tuberkulose (*Zeits. f. Hyg.*, vol. 106, 1926, p. 1).
- LISTER. — Etude expérimentale des vaccinations préventives contre l'infection pneumococcique chez le lapin et chez l'homme (*Publ. of South African Institute for Med. Res.*, 1^{er} octobre 1916).
- LOGAN (W. R.) and SMEALL (J. F.). — Une méthode directe d'identification du groupe des pneumocoques (*British Med. Journ.*, 30 janvier 1932, p. 188).
- METCHNIKOFF. — Etudes sur l'Immunité (*Ann. de l'Inst. Past.*, 1891, t. V, p. 473).
- MISHULOW (L.). — Voir :
COOPER (G.), MISHULOW and BLANC.
- MORGAN (H. I.). — Voir :
AVERY (O. T.) and MORGAN.
- NEUFELD (F.). — Ueber die Agglutination der Pneumokokken und über die theorien der Agglutination (*Zeitsch. f. Hyg. u. Infectk.*, 1902, vol. 40, pp. 54-72).

- NEUFELD (F.) und HAENDEL. — Sur la préparation et le titrage du sérum antipneumococcique. Aperçus sur un traitement spécifique de la pneumonie (*Zeitsch. f. Immunitätsforschung*, 1909, v. 5, p. 159).
- NEUFELD (F.). — Article « Pneumocoques » (in *Kolle et Wasserman*, éd. 1928).
- NEUFELD (F.) und ETINGER-TULCZYNSKA (R.). — Nasale Pneumokokken Infektionen und Pneumokokken-Keimtrager in Tierversuch (*Zeitsch. f. Hyg.*, vol. 112, 1931, pp. 492-526).
- NEUFELD (F.). — Über den derzeitigen Stand der Pneumokokkenforschung (*Klin. Woch.*, n° 39, p. 1652).
- NEUFELD (F.) und ETINGER-TULCZYNSKA (R.). — Untersuchungen über die Pneumokokkensenke des Meerschneinchens (*Zeitsch. f. Hyg.*, vol. 114, 1932-1933, pp. 324-346).
- Schnell diagnoser der Pneumokokken typen aus dem Auswurf (*Zeitsch. f. Hyg.*, vol. 115, 1933, pp. 431-435).
- Pneumokokken befunde bei schnupfenkranken Säuglingen und Kleinkindern (*Zeitsch. f. Hyg.*, vol. 115, 1933, pp. 598-607).
- NEUFELD (F.) und HELGA-KUHN. — Pneumonies expérimentales de la souris (*Zeitsch. f. Hyg.*, vol. 116, 1935, p. 697).
- NEUFELD (F.) und HELGA-KUHN. — Recherches avec injections pulmonaires chez des souris, des cobayes et des lapins (*Zeitsch. f. Hyg.*, vol. 117, 1935-1936, p. 540).
- NICOLLE (M.), JOUAN et DÉBAINS (E.). — Note sur les bactéries inagglutinables (*Soc. Biol.*, 12 octobre 1918).
- NICOLLE (M.) et DÉBAINS (E.). — Sur les races de pneumocoques avec remarques générales sur les antigènes. (*Ac. de Médecine*, séance du 24 juin 1919).
- Races du pneumocoque (*Ann. Ins. Pasteur*, avril 1920).
- PARK and WILLIAMS, COLLINS, LONGCOPE et FOX, NORIS and PAPPENHEIMER, DUVAL and LEWIS, BURGER, HISS, WOOD, LONGCOPE. — Recherches sur le pneumocoque. Département de la Santé New-York (*J. of Exp. Med.*, vol. 7, 1905, p. 401, et *Bull. Inst. Past.*, 1906, p. 59).
- PARK and WILLIAMS. — *Pneumococcus mucosus* (*J. of Exp. Med.*, 1905, vol. 7, p. 403).
- PEARLMAN (Stanley M.). — Zur Bakteriologie und Typenlehre der Pneumokokkenkrankungen (*Arch. für Hyg. und Bakteriologie*, vol. 114, 1935, p. 1033).
- PLUMMER (N.). — Voir :
- CECIL (K. L.) and PLUMMER (N.).

- POCHON (J.). — Sur la répartition des nouveaux groupes de pneumocoques (G. Cooper) chez les malades de la région parisienne (*C. R. Soc. Biol.*, séance 6 juin 1936, tome 122, année 1936, p. 545).
- RAKE (G.). — Pathology of pneumococcus infection in mice following intranasal instillation (*J. of Exp. Med.*, vol. 63, 1936, pp. 17-31).
- Pathogenesis of pneumococcus infections in mice (*J. of Exp. Med.*, vol. 63, 1936, pp. 191-207).
- RAPHAEL (Mlle). — Voir :
COTONI (L.), TRUCHE (C.) et Mlle RAPHAEL.
- ROBINSON (G. H.). — *J. of Infectious Diseases*, 1927, t. 41, p. 417, cité par G. COOPER, 1929).
- ROSENSTEIN (C.). — Voir :
COOPER (G.), EDWARDS (M.), ROSENSTEIN (C.), COOPER (G.), ROSENSTEIN (C.), WALTER (A.).
- ROSS (V.). — The rôle of the soluble specific substance in oral immunization against pneumococcus type I (*J. of Exp. Med.*, v. 54, 1931, pp. 899-923).
- Oral immunization against pneumococcus type II and III, and the normal variation in resistance to these types among rats (*J. of Exp. Med.*, vol. 54, 1931, pp. 875-898).
- SABIN (A. B.). — Immediate Pneumococcus typing directly from sputum by the Neufeld Reaction (*J. Am. Med. Ass.*, 20 mai 1933, vol. 100, pp. 1584-1586).
- SACQUÉPÉE (E.). — Voir :
DOPTER et SACQUÉPÉE.
- SCHERP. — Voir :
HEIDELBERGER (M.), KENDALL (F.) and SCHERP.
- SILBERSCHMIDT. — Essais d'immunisation par inhalation (*Ann. Inst. Pasteur*, vol. 52, 1934, p. 690).
- SMEALL. — Voir :
LOGAN and SMEALL.
- STILLMAN (E. G.). — The presence of bacteria in the lungs of mice following inhalation (*J. Exp. Med.*, vol. 38, 1923, p. 117).
- Persistence of inspired bacteria in the lungs of alcoholized mice (*J. Exp. Med.*, vol. 40, 1924, pp. 355-361).
- Production of immunity in mice by inhalation of pneumococci (*J. Exp. Med.*, vol. 40, 1924, p. 567-574).
- STILLMAN (E. G.) and BRANCH (A.). — Experimental production of pneumococcus pneumonia in mice by the inhalation method (*J. Exp. Med.*, vol. 40, 1924, p. 733-743).

STILLMAN (M. D.) and BRANCH (A.). — Early pulmonary lesions in partially immune alcoholized mice following inhalation of virulent pneumococci (*J. of Exp. Med.*, vol. 51, 1930, pp. 275-283).

TROISIER (J.), BARIÉTY (M.) et BROUET (G.). — L'épreuve du péritoine de la souris pour le diagnostic rapide des pneumococcies (*Soc. Méd. Hôpitaux Paris*, 3 mai 1935, n° 15, pp. 756-767).

— Epreuve du péritoine de la souris pour le diagnostic rapide des pneumococcies. (*Revue critique de Pathologie et de Thérapeutique*, vol. 6, sept.-oct. 1935, n° 3, pp. 97-107).

— La pneumococcie prolongée de la souris (*Soc. Biologie*, 15 février 1936, vol. 12, n° 7, pp. 641-642).

— Le diagnostic rapide des pneumococcies. L'épreuve du péritoine de la souris (*Presse Médicale*, n° 7, 23 janvier 1937, pp. 121-123).

— Le diagnostic rapide des pneumococcies. L'épreuve du gonflement de la capsule (*Presse Médicale*, n° 14, 17 février 1937, pp. 250-252).

TRUCHE (C.). — Voir :

COTONI (L.), TRUCHE (C.) et Mlle RAPHAEL, COTONI et TRUCHE.

WADSWORTH (A. B.) and BUTLER (K. M.). — A study of the changes of virulence of the pneumococcus at different periods of growth and under different conditions of cultivation in media (*J. of Exp. Med.*, vol. 28, 1918, pp. 791-805).

WALTER (A. W.). — Voir :

COOPER (G.), ROSENSTEIN (C.), WALTER (A. W.), PEIZER, COOPER (G.) and WALTER (A. W.).

WEBSTER (L. W.) and HUGHES. — The incidence and spread of pneumococci in the nasal passages and throats of healthy persons (*J. of Exp. Med.*, vol. 53, 1930, pp. 535-566).

WEBSTER (L. W.) and CLOW (A. D.). — The association of pneumococci, hemophilis influenzae and streptococcus hemolyticus with coryza, pharyngitis and sinusitis in man (*J. of Exp. Med.*, vol. 55, 1931, pp. 445-453).

— Intranasal virulence of pneumococci for mice (*J. of Exp. Med.*, vol. 58, 1933, pp. 465-483).

WILLIAMS. — Voir :

PARK and WILLIAMS.

WILLIAMS and GURLEY. — *J. of Bacteriology*, t. 23, 1932, p. 241.

WOLF (M.). — Les pneumococcies. Infections pulmonaires et septicémies à pneumocoques (Le problème de la pneumonie franche aiguë) (*Presse Médicale*, n° 54, 7 juillet 1934, p. 1093).

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	19
CHAPITRE PREMIER. — Structure chimique des pneumocoques.	23
CHAPITRE II. — La capsule du pneumocoque	31
I. — Mise en évidence de la capsule	33
II. — Réaction de gonflement spécifique des capsules....	36
III. — Réactions de gonflement non spécifique des capsules.	39
IV. — Expériences personnelles	40
CHAPITRE III. — Agglutination. Nouvelle classification des pneumocoques	43
I. — Techniques	45
II. — Classification des pneumocoques	49
III. — Expériences personnelles	61
CHAPITRE IV. — Recherches expérimentales	63
I. — Infection de la souris par inoculation sous-cutanée.	65
II. — Infection de la souris par inoculation intra-péritonéale	68
III. — Infection de la souris par voie respiratoire.....	69
IV. — Expériences personnelles sur la maladie expérimentale de la souris	75
CHAPITRE V. — Méthodes de diagnostic rapide des pneumococcies	113
I. — Méthodes préconisées	115
II. — Expériences personnelles, déductions pratiques ..	119
CHAPITRE VI. — Traitement sérothérapique des pneumococcies	131
CONCLUSIONS	145
BIBLIOGRAPHIE	151

